UNIVERSITÉ DE NANCY — FACULTÉ DE PHARMACIE
1919-1920 N° 69

# UNE NOUVELLE ESPÈCE CHROMOGÈNE DES EAUX

# BACILLUS BRUNTZII. NEPVEUX

## (NOV. SP.)

## THÈSE

*Présentée et soutenue publiquement le 26 juillet 1920*
*à la Faculté de Pharmacie*

POUR OBTENIR LE TITRE DE

Docteur de l'Université
(MENTION PHARMACIE)

PAR

**M. Floride NEPVEUX**

Pharmacien de 1re classe
Lauréat Médaille d'Or de la Faculté de Pharmacie de Paris
Interne des Hôpitaux
Chef de Laboratoire à l'Hôpital de la Charité
(Service du professeur Marcel Labbé)
Né à Maubeuge (Nord), le 21 juillet 1888

EXAMINATEURS DE LA THÈSE { MM. BRUNTZ, HOLLANDE, LASSEUR

PARIS
IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & Cie, ÉDITEURS
15, rue Racine, 15

1920

UNE NOUVELLE ESPÈCE CHROMOGÈNE DES EAUX

# BACILLUS BRUNTZII. NEPVEUX

(NOV. SP.)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547215_0056

UNIVERSITÉ DE NANCY — FACULTÉ DE PHARMACIE
1919-1920
N° 60

# UNE NOUVELLE ESPÈCE CHROMOGÈNE DES EAUX

# BACILLUS BRUNTZII. NEPVEUX

(NOV. SP.)

## THÈSE

*Présentée et soutenue publiquement le 26 juillet 1920*
*à la Faculté de Pharmacie*

POUR OBTENIR LE TITRE DE

Docteur de l'Université
(MENTION PHARMACIE)

PAR

**M. Floride NEPVEUX**

Pharmacien de 1re classe
Lauréat Médaille d'Or de la Faculté de Pharmacie de Paris
Interne des Hôpitaux
Chef de Laboratoire à l'Hôpital de la Charité
(Service du professeur Marcel Labbé)
Né à Maubeuge (Nord), le 21 juillet 1888

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

EXAMINATEURS DE LA THÈSE : MM. BRUNTZ, HOLLANDE, LASSEUR

PARIS
IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & Cie, ÉDITEURS
15, rue Racine, 15

1920

# UNIVERSITÉ DE NANCY — FACULTÉ DE PHARMACIE

**Doyen : M. Bruntz ✻, I ✻.**

**Assesseur : M. Favrel ✻, I ✻.**

*Professeurs :*

| | |
|---|---|
| MM. Favrel, ✻, I ✻ | Chimie organique. |
| Grelot, ✻, I ✻ | Pharmacie galénique. |
| Bruntz, ✻, I ✻, ✻, ✻ | Matière médicale. |
| Douris, ✻ | Analyse chimique et Toxicologie. |
| Hollande, ✻ | Histoire naturelle. |

*Chargés de cours magistraux :*

| | |
|---|---|
| MM. Pastureau, ✻ | Pharmacie chimique. |
| Seyot, ✻, I ✻ | Histoire naturelle (Botanique). |

*Agrégé libre :*

| | |
|---|---|
| M. Girardet, I ✻ (en congé) | Chimie et Toxicologie. |

*Chargés de cours complémentaires :*

| | |
|---|---|
| MM. Favrel, ✻, I ✻ | Chimie minérale et Minéralogie. |
| Pillot, I ✻ | Physique. |
| Douris, ✻ | Chimie biologique. |
| Grélot, ✻, I ✻ | Hydrologie et Géologie. |
| Lasseur, ✻, ✻ | Bactériologie. |
| Vernier, ✻ | Hygiène. |
| N. | Législation. |

*Chefs de travaux :*

| | |
|---|---|
| M. Cordebard | Chimie, Analyse chimique et Toxicologie. |
| Seyot, ✻, I ✻, chargé des travaux. | Micrographie. |
| Gillot, ✻ | Pharmacie. |
| Vernier, ✻ | Microbiologie et Parasitologie. |
| Pillot, I ✻, chargé des travaux. | Physique. |

*Secrétariat :*

| | |
|---|---|
| MM. Bertrand, I ✻ | Secrétaire-délégué. |
| Tribolet | Commis. |
| F. Lambert des Cilleuls ✻, ✻, I ✻ | Secrétaire honoraire. |

*L'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les improuver.*

A Monsieur le Professeur BRUNTZ

Doyen de la Faculté de Pharmacie

*Hommage respectueux*
*de reconnaissance.*

À Monsieur le Professeur Marcel LABBÉ

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris
Médecin de l'Hôpital de la Charité

*Hommage de reconnaissance et de respectueux attachement.*

UNE NOUVELLE ESPÈCE CHROMOGÈNE
DES EAUX

# BACILLUS BRUNTZII. NEPVEUX

(NOV. SP.)

---

## INTRODUCTION

Au cours de la dernière guerre, les Bactériologistes ont largement contribué par leurs travaux à assurer la protection sanitaire des troupes. D'un labeur incessant, souvent effectué dans des conditions pénibles, sont sorties d'intéressantes découvertes, telles que celles relatives aux spirochétoses ou aux infections anaérobies des plaies de guerre.

Tous les laboratoires d'armée ont dû surveiller les eaux de boisson et tenir à jour le dossier bactériologique des sources livrées à la consommation.

C'est en effectuant ce travail que M. Ph. Lasseur a pu isoler des eaux de la commune de Laître-sous-Amance (Meurthe-et-Moselle), un Bacille susceptible de produire un pigment rouge violacé. Il a bien voulu m'en confier l'étude ; je le remercie de sa marque de confiance. Pendant toute la durée de mes recherches, il m'a encore aidé et conseillé, je lui en exprime ma profonde reconnaissance.

Mes recherches ont été conduites d'abord dans le laboratoire d'armée où j'étais affecté en qualité de Pharmacien aide-major, ensuite, au laboratoire de Bactériologie de la Faculté

de Pharmacie de Nancy, où mon Maître, M. le Doyen Bruntz, m'a accueilli avec bienveillance. En témoignage de reconnaissance, je suis particulièrement heureux de pouvoir donner son nom au germe isolé par M. Ph. Lasseur et étudié par moi.

Dans le même esprit, j'adresse à M. le Professeur Vuillemin, de la Faculté de Médecine de Nancy, l'hommage de ma gratitude pour l'intérêt qu'il m'a sans cesse témoigné.

Je remercie aussi M. le Professeur agrégé Thiry, de la Faculté de Médecine de Nancy, qui a bien voulu mettre à ma disposition sa profonde connaissance de la fonction chromogène ; de même M. le Professeur Hollande, qui a accepté de faire partie de mon jury, et tous mes Maîtres des Facultés de Médecine et de Pharmacie de Paris et de Nancy.

Enfin, à ce moment qui marque la fin de mes études, je tiens à adresser un hommage tout particulier de reconnaissance à M. le Professeur M. Labbé, de la Faculté de Médecine de Paris, qui, en m'accueillant à ses côtés et en acceptant ma collaboration, m'a fait un honneur dont je sais toute la valeur et que je m'efforcerai de mériter toujours mieux dans l'avenir.

En effectuant mes recherches, j'ai eu pour but de caractériser et de spécifier le Bacille étudié et pour cela je me suis efforcé de suivre aussi près que possible les conseils donnés par M. le Professeur Grimbert (1903) dans son mémoire : *Diagnostic des Bactéries par leurs fonctions biochimiques.*

« Quiconque, dit-il, ayant isolé un Microbe, a voulu l'identifier avec une des nombreuses espèces décrites, a dû certainement être frappé de la confusion qui existe dans la description de ces espèces... La description de leurs caractères ne suivant aucun plan arrêté, offre les variations les plus déconcertantes. Tantôt, l'auteur s'attache à la morpho-

logie, laissant dans l'ombre les particularités biologiques qu'il eut été intéressant de connaître, tantôt, l'aspect des cultures retient seul son attention.

« D'autre part, quand on vient de répéter une expérience décrite, il n'est pas rare d'obtenir des résultats en désaccord avec ceux de l'auteur, tout simplement parce que, faute de détails précis, on n'a pas su se placer dans des conditions d'expériences rigoureusement identiques... Il serait donc à souhaiter de voir une entente s'établir entre tous les Bactériologistes, pour adopter une marche méthodique unique dans la description des Bactéries, en ayant soin de spécifier la condition des expériences. »

M. Grimbert insiste donc sur la nécessité :

1° De déterminer et de fixer la composition des milieux de culture universellement employés et le mode rationnel de leur préparation ; 2° d'établir des règles conventionnelles pour l'examen des propriétés morphologiques du microbe.

Tout mon travail procède de ces directives. L'étude biochimique de *B. Bruntzii* y occupe une place importante, elle a été poursuivie sur des cultures obtenues sur milieux nutritifs rigoureusement définis et en particulier sur milieux de Lasseur dont nous rappelons les formules :

*Milieu synthétique (S. I) de Lasseur*

| | |
|---|---|
| Eau | 100 gr. — |
| Asparagine | 0 gr. 70 |
| Glycérine | 2 gr. 50 |
| Phosphate dipotassique | 0 gr. 10 |
| Sulfate de magnésie | 0 gr. 50 |
| Chlorure de calcium | 0 gr. 04 |
| Sulfate ferreux | 0 gr. 01 |

*Milieu synthétique (S. II) de Lasseur*

| | |
|---|---|
| Eau | 100 gr. — |
| Glycérine | 2 gr. |

| | |
|---|---|
| Glucose | 1 gr. — |
| Asparagine | 0 gr. 90 |
| Succinate d'ammoniaque | 0 gr. 10 |
| Phosphate dipotassique | 0 gr. 25 |
| Sulfate de magnésie | 0 gr. 50 |
| Chlorure de calcium | 0 gr. 04 |
| Sulfate de fer | 0 gr. 10 |

Au cours de cette étude, nous désignons ces deux milieux par les abréviations S. I. et S. II.

* * *

Notre mémoire est divisé en six Chapitres.

Dans le Chapitre Ier nous avons exposé la *Morphologie* et la *Physiologie* de *B. Bruntzii* et particulièrement la forme et les dimensions.

Le Chapitre II est consacré à l'étude des *Propriétés Biologiques ;* la description des *cultures sur gélatine* a retenu notre attention, de même que la détermination du *point osmotique* et celle de *l'action protéolytique du germe*, toutes deux intéressantes au point de vue diagnose.

Le Chapitre III traite des *Cultures de B. Bruntzii en milieux chimiquement définis*. Nous avons démontré le rôle spécifique du fer dans la production de la substance mère des corps colorés et du pigment rouge.

Dans le Chapitre IV, nous avons étudié sommairement les *Propriétés physico chimiques du pigment* et *le Spectre d'absorption.*

Le Chapitre V a pour objet le *Pouvoir pathogène* et le *Pouvoir agglutinogène.*

Enfin, le Chapitre VI renferme une liste de *Bacilles produisant des corps colorés rouges*, ayant des caractères communs avec *B. Bruntzii* mais s'en différenciant toutefois incontestablement.

Un Index bibliographique termine notre exposé.

## CHAPITRE PREMIER

### ORIGINE

Le Bacille qui fait l'objet de ce travail a été isolé d'une eau qui sourd du lias moyen à Laître-sous-Amance (Meurthe-et-Moselle). Cette eau traverse une région qui a été le théâtre des opérations militaires connues sous le nom de *Bataille du Grand Couronné de Nancy.*

Des considérations d'ordre géologique laissaient présumer une contamination possible de la source de Laître. En effet, Imbeaux (1897) dans son étude des eaux potables en Meurthe-et-Moselle, montre que « les nappes profondes sont seules bien sûres, telles sont chez nous les grandes nappes médio-conchyliennes, bajociennes et infracoralliennes... Les calcaires minces et fissurés ne donnent que des eaux douteuses, dont le nombre de germes, comme le débit d'ailleurs, augmentent rapidement après des pluies intenses et qu'il est absolument nécessaire de protéger efficacement : telles sont les zones supérieures du muschelkalk, la dolomie moellon, le calcaire du lias. »

L'analyse bactériologique d'un échantillon de l'eau de source de Laître-sous-Amance prélevé en février 1915 a confirmé les prévisions du savant hygiéniste, comme l'indique l'exposé des résultats obtenus :

*Numération après quinze jours*

Bactéries aérobies :

2.000 colonies au centimètre cube (50 0/0 environ sont constituées par des liquéfiants ; 25 0/0 sont fluorescentes).

Bactéries anaérobies :

A 37° C. 100.

A 20° C. 80.

Rapport de Guillermard : 1.000.

Moisissures : 10 colonies au centimètre cube.

Colibacille : 5.000 au litre.

Bacilles typhique et paratyphiques : néant.

Recherche des Streptocoques : négative sur 100 centimètres cubes.

Bactéries putrides de Bonjean : positive sur 1 centimètre cube.

Spécification : *B. fluorescens liquefaciens* (Flugge).

— *B. fluorescens non liquefaciens* (Flugge).

— *B. prodigiosus* Ehrenberg.

— *Micrococcus aquatilis* Meade Bolton.

— *Oospora chromogenes* Gasperini.

## MORPHOLOGIE ET PHYSIOLOGIE

*B. Bruntzii* appartient incontestablement aux Schizomyètes tels que les définit P. Vuillemin (1). Il se présente sous la forme d'un bâtonnet le plus souvent droit ou légèrement arqué rarement, incurvé.

1. « La systématique envisage les Schizomycètes comme un groupe indépendant des animaux et des végétaux. Elle le caractérise par des plastides moins différenciés que la cellule, limités par une membrane du type végétal, isoles ou associés en colonies, se multipliant par scissiparite. » P. Vuillemin (1913), p. 514.

Les extrémités sont le plus souvent acuminées, quelquefois arrondies. Les deux parois de la membrane ne sont pas parallèles : la partie moyenne du plastide bactérien offre d'ordinaire à l'état frais un diamètre un peu supérieur à celui des deux extrémités.

Dans les cultures anciennes, à côté de ces formes en bâtonnets (Pl. I, fig. 1, *a*) on observe aussi des formes courtes, très plasmolysées, et parfois des formes rondes, (Pl. I, fig. 2, *d*,) qui rappelleraient un peu les formes du Vibrion du Choléra. Il est aussi possible d'observer dans les cultures âgées des formes ovoïdes (Pl. I, fig. 3, *f*), qui présentent un cytoplasme très dense sans vacuoles, alors que beaucoup d'autres plastides sont très plasmolysés. Sans doute s'agit-il encore de formes de plasmolyse où le cytoplasme, au lieu de se contracter sous la paroi en bandes ou en boules, se ramasse en un paquet ovoïde ; cette hypothèse étant d'autant plus plausible qu'il est possible de percevoir la membrane à une distance relativement grande du petit sommet.

Une forme rarement rencontrée est celle des grands bâtonnets (Pl. I, fig. 1, *b*), où il semble que l'énergie de croissance l'emporte sur l'énergie de division. Par contre, à côté de ces formes longues, on trouve dans certaines cultures des formes plus courtes que les formes ordinaires (Pl. I, fig. 1, *c*). La valeur de ces formes rares est difficile à préciser actuellement. Il ne nous a pas été donné de rencontrer des formes ramifiées.

La figure 4, planche I, représente des formes identiques, à celles décrites par Fischer comme figures de plasmoptyse. Mais nous devons ajouter que nous n'avons pas réussi à réaliser ces images expérimentalement par des variations brusques de pression osmotique ; ce qui n'implique nullement d'ailleurs que la chose soit impossible.

Au premier abord, *B. Bruntzii* pourrait donc être qualifié de polymorphe : en réalité, les cultures offrent un ensemble homogène ; mais nous ne pouvons pas, dans une culture où tous les stades d'évolution du plastide sont représentés, trouver des formes rigoureusement superposables. Il est indiscutable qu'un plastide à un certain stade de son évolution, par exemple lorsqu'il vient de se séparer de la cellule mère, n'a pas encore l'aspect qu'il aura ultérieurement. « Dans les cultures âgées, les Bactéries sont souvent plasmolysées ou tout au moins présentent une aptitude toute spéciale à la plasmolyse. Ces faits peuvent s'interpréter soit par une variation de la pression osmotique du milieu, soit par une réaction osmotique du plastide, cette réaction trouvant son origine dans une modification du pouvoir osmotique du suc protoplasmique ou dans la variation de la perméabilité du cytoplasme et de la membrane, le plastide jeune et le plastide âgé pouvant fort bien avoir des propriétés différentes » (Lasseur, inédit).

Nous interprétons les variations morphologiques de *B. Bruntzii* dans le sens des conceptions de Winogradski sur le polymorphisme des Bactéries. Cet auteur, en effet, admet que la forme varie avec le développement qui est une succession de formes. Tout être vivant a son évolution propre et la seule constance morphologique qui existe est celle du développement. Il faut toutefois que la nature morphologique de l'espèce puisse se manifester dans des conditions favorables à son existence car, si l'on rend la végétation pénible, on voit apparaître les phénomènes pathologiques qui ne doivent pas être comparés aux phénomènes normaux. Telles sont, par exemple, les modifications du développement observées dans les milieux antiseptiques.

Dans les milieux chlorurés, le germe de Laître offre des

éléments beaucoup plus petits que dans les bouillons normaux et parfois au lieu de Bacilles isolés on observe une suite de Diplobacilles. Lorsqu'on compare deux préparations, l'une effectuée avec une culture sur bouillon ordinaire, l'autre effectuée avec une culture sur bouillon salé à 8 0/0, on a l'impression que l'on a affaire au même Bacille, mais vu à deux grossissements différents. Tout cela explique donc cet autre aspect qui nous montre des plastides plus petits, formant de courtes chaînettes de Diplobacilles à extrémités acuminées.

*Groupement.* — *B. Bruntzii* se présente le plus souvent en diplobacille, il est rarement isolé. On observe parfois des modes de groupement différents : tantôt ce sont deux plastides formant un V très ouvert ; tantôt, mais plus rarement, on observe deux plastides accolés parallèlement à leur grand axe à la façon du B. de Lœffler ; quelquefois, deux Diplobacilles restent accolés bout à bout, mais les plastides paraissent garder leur individualité par groupe de deux, et il ne semble pas que les quatre plastides soient enfermées dans la même gaîne : enfin, exceptionnellement, un pont semble réunir deux plastides : *plasmodème* des auteurs allemands.

## Dimensions du plastide

Actuellement, beaucoup d'auteurs ne paraissent pas attacher grande importance aux dimensions des Bactéries : c'est ainsi que d'excellents manuels décrivent avec beaucoup de détails et de clarté les principaux caractères de tels ou tels agents microbiens, mais oublient volontiers de relater les dimensions du plastide bactérien considéré.

Les successions des formes dans une même culture et les discordances apparentes observées dans la mensuration

expliquent le peu de faveur dont semble jouir ce caractère morphologique.

Sans attacher une valeur absolue aux dimensions du plastide, nous estimons cependant qu'il est intéressant d'en considérer la valeur moyenne.

Avant d'aborder l'exposé des recherches sur *B. Bruntzii*, nous sommes placés à un point de vue plus général en consignant dans un tableau quelques dimensions de plastides bactériens, en exposant quelques considérations générales sur les infiniment petits : les microbes dits « invisibles ». Nous donnons ensuite un aperçu des différents procédés de mensuration avec leurs causes d'erreurs, ainsi que des variations de dimensions suivant le mode d'observation.

## I. *Dimensions de quelques plastides bactériens*

| Désign. des espèces bactér. | Dimensions | Références |
|---|---|---|
| **A. FORMES VÉGÉTATIVES** | | |
| *Bacillus Butschlii* | 4 à 5 μ × 50 à 60 μ | SCHAUDINN 1902 |
| *Bacillus tumescens* | 1,7 μ × 7 μ | A. MEYER 1899 |
| *Spirillum colossus* | 2,5 μ de large | ERRERA 1903 |
| *Sarcina flava* | 1 à 2 μ | ELLIS 1903 |
| *Pseudomonas indigofera* | 0,17 μ × 0,06 μ | MIGULA 1900 |
| *Pseudomonas oliveæ* | 0,2 μ à 0,5 μ | |
| **B. FORMES DE REPOS (entospores)** | | |
| *Bacillus Butschlii* | 5 à 12 μ | A. MEYER 1912 |
| *Bacillus tumescens* | 1,3 à 1,8 μ | — 1912 |
| *Bacillus subtilis* | 0,8 à 0,9 μ × 1,7 à 1,9 μ | — 1912 |
| *Bacillus megatherium* | 1,4 à 2,8 μ × 0,7 à 1,1 μ | NEIDE 1904 |
| *Bacillus mesentericus ruber* | 1,5 à 0,9 μ | — 1904 |
| *Bacillus lactis Flügge* | 2 μ × 0,95 μ | — 1904 |
| *Bacillus alvei* | 1 μ × 1,1 μ | — 1904 |

II. *Dimensions de quelques cellules végétales*

| Désignation des cellules | Désignation des plantes | Dimensions en μ |
|---|---|---|
| Spore | *Osmunda regalis* | 65 μ environ |
| Zygospore | *Spirogira nitida* | 160 μ × 100 μ |
| Spores | Ustilaginées | 8 μ à 24 μ |
| — | Urédinées | 17 μ à 30 μ |
| — | Basidiomycètes | 6 à 9 μ |
| Ascospores | *Eurotium repens* | 6 μ |
| — | *Valsa nitida* | 6 μ × 1 μ |
| Sporidies | *Thecaspora Padi* | 3 μ |
| Noyaux | *Fritillaria imperialis* | 50 μ × 25 μ |
| — | *Hyacinthus orientalis* | 20 μ |
| — | *Selaginella* | 2 μ |
| — | *Aspergillus repens* | 0, 5 μ |

Comme l'indique le tableau I, la plus petite dimension de plastides bactériens, signalée par les auteurs, se rapporte au *speudomonas olivæ* qui d'après A. Meyer (1912) est la plus petite « *oïdie* » dont il serait possible de percevoir la forme dans l'éclairage à fond clair.

Cependant, pour Schrœder (1886), cité par Gotschlich (1911): « *Le Micrococque de la formation progressive des abcès chez le Lapin* » n'aurait que 0 μ 15 de diamètre.

D'après Nocard et Roux, Borrel, Salimbeni et Dujardin-Beaumetz (1898), l'examen microscopique des cultures de l'agent de la « *peripneumonie contagieuse* » montre, à un très fort grossissement (environ 2.000 diamètres) et à un puissant éclairage, une infinité de petits points réfringents d'une si grande ténuité qu'il est difficile d'en déterminer exactement la forme (p. 224) : les dimensions de ce micro-organisme seraient très inférieures à celles des plus petits Microbes connus (p. 249).

Depuis la découverte de Nocard et Roux, on attribue volontiers certaines infections à des agents ayant des dimensions inférieures aux plus petits Microbes observés avec les meilleurs instruments d'optique, et passant à travers les parois

poreuses des filtres, telles sont : la variole, la rage, la fièvre jaune, etc.

Mais il ne suffit pas qu'un agent passe à travers les parois des filtres pour qu'il soit nécessairement au-dessous de la visibilité : ainsi le *Spirillum parvum* Esmarch, bien que mesurant 0,1 μ à 0,3 μ × 1 à 3 μ passe à travers les parois de certaines bougies.

Remarquons en outre, qu'il a été possible de rendre visible le virus de la petite vérole du Pigeon, du *molluscum contagiosum*, de la peste aviaire. Pour Gotschlich (in Kolle et Wassermann, 1913, p. 30) ces agents se présenteraient sous la forme de petits corpuscules ronds ayant au plus 0,25 μ de diamètre. Ces micro-organismes ayant peu d'affinité pour les colorants sans mordançage, on ne réussirait à les mettre en évidence que par la méthode de coloration des fouets de Loeffler ou par celle de Giemsa.

Il semble bien que les méthodes employées pour les recherches de ces agents microbiens à peine visibles, pivotent autour de cette idée : ne pas teindre l'organisme, mais le gonfler considérablement ou l'imprégner de substances étrangères (métaux, colorants colloïdaux) augmentant son volume. C'est du moins ce qui semble ressortir des travaux de Borrel, Dujardin-Beaumetz, Jantet et Jouan (1910) lorsqu'ils parlent de « surcoloration ». Le Microbe de la Péripneumonie est évidemment d'un extrême intérêt, puisque à notre connaissance, c'est le seul virus filtrant que l'on ait obtenu en culture pure. Mais, il n'est pas démontré d'une façon irréfutable qu'il s'agisse d'une Bactérie. Nocard, Roux, et leurs collaborateurs et élèves n'ont vu dans leurs préparations, que des granulations très fines, mais il était impossible d'attribuer aux éléments microbiens un aspect bien défini.

Bordet (1910) à l'aide de nouveaux milieux, et par l'emploi

du Giemsa à chaud, décèle des formes filamenteuses, arquées, flexueuses, spiralées, et des granulations arrondies. Mais le polymorphisme atteint son apogée avec les travaux de Borrel, de Dujardin-Beaumetz, de Jeantet et de Jouan (1910) (voir fig. n. m. p. 170, *loc. cit.*).

L'examen ultra microscopique semble, comme la méthode de surcoloration confirmer les vues de ces auteurs en ce qui concerne le « polymorphisme extraordinaire de ce microbe diplocoque, tétragène, morula, filament, chaînette noyée dans une gangue visqueuse ».

Nous n'avons pas ici à discuter les causes d'erreurs possibles dans les préparations de ce genre, mais la prudence nous impose de faire des réserves en ce qui concerne le rattachement du Microbe de la Péripneumonie au genre Schizomycètes les affinités de ce genre restent indécises, il n'y a pas plus de raison de le rapprocher des Champignons, des Algues ou des Protozoaires.

Pour Roux (1903) « il existe tout un monde d'êtres invisibles et depuis longtemps on est enclin à les rendre responsables de toutes les maladies dont le Microbe n'est pas connu : fièvre aphteuse, Péripneumonie bovine, virus myxomateux, mosaïque du tabac, horse-sickness, peste des Oiseaux, fièvre jaune, peste bovine, clavelée ».

L'affinité de tous ces germes est aussi peu précise que celle du Microbe de la Péripneumonie. Il en est de même du Microbe de la Diphtérie des Poules, étudié par J. Bordet et Fally (1910).

Les auteurs ne connaissent « aucun Microbe qui ne soit aussi petit ». « L'examen microscopique de la culture montre qu'elle est constituée de Microbes très petits n'apparaissan souvent, au plus fort grossissement, que comme des points parfois un peu effilés en batonnets minces et courts. » De

même, Cotton et Mouton (1906, p. 226), étudiant le Microbe de la Péripneumonie, estiment « que l'examen après coloration fait avec les meilleurs appareils microscopiques, ne montre qu'un fond granulé dont les éléments sont indistincts. L'ensemble de ces faits permet de dire que tous ces Microbes après teinture ont des dimensions qui sont encore au-dessous de la limite de visibilité microscopique, mais qui ne lui sont pas très inférieures. La plupart des Microbes dits invisibles, ne doivent pas être extrêmement plus petits, puisque les bougies serrées les arrêtent.

Lorsque le grossissement est suffisant, l'image d'un point brillant est une tache de dimensions sensibles sans relations avec la grandeur de l'objet. Il en résulte qu'un objet microscopique, observé sur fond noir, paraît plus gros qu'il ne l'est réellement et qu'au contraire, observé comme d'habitude par transparence, il paraît plus petit. Il ne faut donc pas attribuer une valeur absolue aux dimensions que les Bactériologistes indiquent pour les très petits objets voisins de la limite de visibilité.

D'après Roux (1903) avec les meilleurs instruments, nous ne pouvons distinguer un corpuscule de moins de $0,1\mu$.

Le chiffre donné par Roux est peut-être un peu trop élevé. En effet Cotton et Mouton (1906) montrèrent que la plus faible distance résoluble a pour valeur :

Ces auteurs (p. 16) ajoutent qu'« avec les meilleurs instruments existants, on voit que 2 points lumineux ne peuvent être séparés que si leur distance est supérieure à :

$$\frac{\lambda o}{2n \sin \alpha}$$

$\lambda o$ = longueur d'onde dans le vide.
$n$ = indice de réfraction.

$\frac{\lambda o}{2,5}$ si les points se trouvent dans l'eau, et à $\frac{\lambda o}{2,8}$ si les objets sont dans l'huile ou dans un milieu d'indice analogue, et on

voit aussi que l'on ne peut guère espérer aller plus loin » soit environ : $\frac{\lambda o}{3}$ on aurait 0,2 μ et non 0,1 μ comme l'indique Roux.

Avec les ultra-microscopes, il est possible de voir des corpuscules de l'ordre du μμ, mais nous n'avons aucun renseignement sur la forme, ni sur leurs détails, « seules la coloration et l'intensité des rayons qu'elle nous envoie, et qui viennent former sur la rétine une petite tache de diffraction » nous permettront de les classer en divers groupes.

Ces considérations sur les infiniment petits nous invitent à envisager les dimensions minima d'un protoplaste et à nous poser la question suivante : Y a-t-il des Organismes qui soient extrêmement petits, en comparaison des Microbes ordinaires comme ceux-ci le sont par rapport aux grands animaux et aux grandes plantes ?

Si l'on considère une Bactérie banale, *B. termo* Dujardin, par exemple, mesurant de 1,5 μ à 2 μ, on voit que ses dimensions linéaires sont un million de fois moindres que celles de l'homme et cent millions de fois moindres que celles des arbres les plus élevés : Certains Sequoyas de Californie et certains Eucalyptus de l'Australie atteignent environ 150 mètres de haut.

*A priori*, rien ne semble s'opposer à ce qu'il existe des êtres vivants un million de fois plus petits que les Bactéries connues actuellement. Nous savons que la matière est formée de parties très petites mais non infiniment petites, les molécules étant constituées elles-mêmes par la réunion d'atomes. Si l'on admet cette hypothèse, il en résulte que des êtres même les plus simples, qui sont des agrégats de molécules complexes, diverses ne peuvent descendre au-dessous de certaines dimensions. Appliquant les données de la chimie-physique à l'étude du *M. progrediens*, Errera montre que cet

organisme contiendrait environ 10.000 atomes de soufre et au plus 30.000 molécules albuminoïdes (1).

Le *M. progrediens* mesure 0 μ 15 de diamètre et comme les volumes des Organismes semblables sont proportionnels aux cubes de leurs dimensions linéaires. On trouvera par analogie qu'un Microcoque de 0 μ 1 renfermera au maximum 8.888 molécules de substances albuminoïdes et 2.960 atomes de soufre. Un Microcoque de 0 μ 01 (soit 1/15 du diamètre du *M. progrediens*) aurait moins de 9 molécules albuminoïdes et 3 atomes de soufre. « Il faut donc conclure avec un degré de probabilité qui est du même ordre que la probabilité de la théorie moléculaire de la matière, qu'il ne saurait exister des Organismes qui soient aux Bactéries ordinaires ce que celles-ci sont aux Organismes supérieurs ». L'existence de Microbes quelques centaines de fois plus petits que ceux que nous connaissons serait déjà une impossibilité.

Les Microbes dits « invisibles » ne sont donc très probablement qu'un peu plus petits que les microbes « visibles ».

## Procédés de mensuration

### I. — Procédés directs

Ils sont réalisés par l'usage du micromètre oculaire et du micromètre objectif.

a) *Mensuration à l'aide du micromètre oculaire.* — Les causes d'erreur résultant de l'emploi de ce procédé sont connues, elles s'expliquent par l'erreur de parallaxe et par la

1. Mac Kendrick arrive à cette conclusion que les plus petites particules organisées visibles au microscope contiennent environ 1.250 molécules de matières protéiques. Malgré les divergences de vues de Kendrick et de Errera, le sens général des conclusions reste le même.

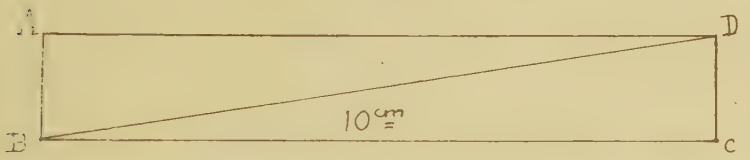
difficulté d'appréciation des fractions de divisions du micromètre oculaire.

On ne peut apprécier que la 1/2 division, pas même avec exactitude.

Les micromètres oculaires à échelle mobile fournissent des résultats assez exacts si l'on se conforme à certaines prescriptions.

b) *Mensuration à l'aide du micromètre objectif.* — On peut avoir recours au dessin à la chambre claire.

Ici encore on se heurte à la difficulté d'apprécier les fractions au double décimètre. Mais on peut avantageusement utiliser le procédé de Langeron (1913) en se rapportant au shéma ci-dessous :




A.-B. Valeur de 1 division du micromètre, objectif.

B'-C. Valeur prise arbitrairement : par exemple, 10 centimètres.

Au lieu d'utiliser le dessin sur carton ou celluloïde préconisé par Langeron, Lasseur et G. Parisot utilisent une graduation transparente, obtenue par une photographie sur verre du cliché du dessin de Langeron.

L'avantage est que par transparence on peut faire glisser ce cliché sur le papier, reproduisant le dessin de l'Organisme étudié jusqu'à ce que ses deux extrémités soient tangentes à l'horizontale et à la diagonale du rectangle gradué. Il suffira de lire le nombre exprimé en $\mu$ et fractions de $\mu$.

On peut aussi photographier l'objet et mesurer les dimensions de la substance décomposée, sans oublier que l'argent

réduit est en rapport avec l'intensité lumineuse, la nature des radiations et le temps d'exposition.

### II. — Procédés indirects

Parmi ceux-ci, citons la filtration qui n'est pas sans critique, car elle se complique de la viscosité du milieu, de la compressibilité et de l'élasticité des plastides considérés.

## Variations des dimensions suivant le mode d'observation

C'est un fait d'expérience que les dimensions des germes sont variables selon qu'on examine ceux-ci sur le frais ou, après dessication et coloration. Tous ceux qui ont isolé des germes par hémoculture dans les fièvres continues, tels que les Bacilles typhiques, savent qu'examinés dans le bouillon d'isolement, ces germes paraissent beaucoup plus grands qu'après dessication, fixation à la flamme et coloration par la méthode de Gram. D'ailleurs, Gottheil (1901) étudiant le *B. Graveolens* précise comme il suit les variations des dimensions de ce germe.

Largeur des batonnets (expérimée en μ).
- Plastides montés à l'eau.
  - Desséchés et colorés à la fuchsine : A = 1 μ 39 GOTTHEIL (1901)
  - Vivants. B = 1 μ 50
- Plastides desséchés et colorés à la fuchsine.
  - Montés à l'eau. A = 1 μ 39
  - Montés dans le baume. C = 1 μ 11

Nous pouvons interpréter (1) les chiffres de la façon suivante :

1. Cette interprétation des résultats nous a été suggérée par M. le Professeur P. Vuillemin.

A = Mesure du plasma coloré = 1 μ 39.

B = Mesure du plasma coloré + membrane = 1 μ 50.

C = Mesure du plasma coloré contracté dans le baume = 1 μ 11.

$\frac{A}{C} = \frac{1,39}{1,11} = 1,25$ contraction dans le baume du plasma coloré.

$\frac{B}{C} = \frac{1,50}{1,11} = 1,35$

Largeurs des sporanges (exprimée en μ).

- Plastides montés à l'eau. — E = largeur du sporange, d'après GOTTHEIL 1 μ 1 à 1 μ 2
- Plastides desséchés, colorés à la fuchsine, ou au bleu de méthylène et montés dans le baume. — F = 0 μ 5 à 0 μ 7

Nous avons l'explication des différences de dimensions, car dans E, la membrane est distendue et dans F la membrane est rétractée et la valeur est exprimée par :

$$\frac{1,15}{0,6} = 1,91$$

GRIMME (1902), estime que la largeur des Bactéries desséchées, montées à l'eau, est à la largeur des Bactéries desséchées et montées au baume comme 3 est à 2 = 3/2. Or, si nous établissons ce même rapport avec les chiffres de GOTTHEIL nous obtenons : $\frac{1,5}{1,1}$ soit $\frac{3}{2,2}$ on ne peut guère s'attendre à une concordance meilleure entre des mesures effectuées il y a vingt ans avec des appareils d'une précision encore très limitée.

Si nous considérons enfin la Spore de la *Sarcina ureæ*, nous aurons les valeurs suivantes :

Dimensions de la spore (exprimée en μ). { Spore desséchée et montée à l'eau. { Sans coloration = 0 μ 87 (ELLIS 1903). Coloration au bleu de méthylène = 1 μ 25.

Soit un rapport de $\frac{1,25}{0,87} = 1,32$

Il y a lieu d'ajouter que l'examen après coloration présente des inconvénients dont l'importance varie avec le mode et l'intensité de coloration, le mode de fixation, le milieu d'observation.

*Dimensions des plastides de B. Bruntzii*

Etant données les variations des dimensions suivant le mode d'examen, nous avons tenu à préciser les conditions dans lesquelles ont été effectuées les mensurations de *B. Bruntzii*.

| | | Longueur exprimée en μ | | | Largeur exprimée en μ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Min. | Moy. | Max. | Min. | Moy. | Max. |
| *B. Bruntzii* Culture sur milieu S. 1 | 1) Examen à l'état frais. | 1,5 | 1,8 | 2 | 0,5 | 0,65 | 0,75 |
| | 2) Après dessication, fixation à la flamme, coloration à la fuchsine, examen dans le baume du Canada. | 1,25 | 1,4 | 1,5 | 0,3 | 0,45 | 0,55 |

Pour établir un rapport, la longueur paraîtrait préférable parce que le chiffre est plus grand, et l'erreur de mesure serait plus faible. Malheureusement, des cloisons de divisions peuvent passer inaperçues. Aussi avons-nous préféré considérer la largeur, comme élément de comparaison. Gottheil (1901) obtenait :

$$\frac{\text{Largeur du bâtonnet à l'état frais}}{\text{Larg. du bât. desséché, coloré à la fuchsine et monté dans le baume}} = \frac{1\mu,5}{1\mu,1} = \frac{3}{2,2}$$

soit approximativement $\frac{3}{2}$. *B. Bruntzii*, dans des conditions d'examen aussi semblables que possible, donne $\frac{0\mu,65}{0\mu,45} = \frac{2,99}{2,06}$ ou $\frac{3}{2,06}$ approximativement. Nos chiffres se rapprochent

davantage de ceux de Grimme que de ceux de Gottheil. Quoiqu'il en soit, ces chiffres sont du même ordre de grandeur, étant donnée la précision de la méthode. Nous avons donc constaté avec les auteurs que

$$\frac{\text{le plasma + la membrane}}{\text{le plasma coloré et retracé}} = \frac{3}{2}.$$

La membrane, évidemment, ne représente pas le tiers du plastide, puisque d'une part, la coloration a augmenté un peu le volume par dépôt de colorant et que d'autre part, la contraction a diminué les dimensions du plastide. Il est difficile d'établir ce qui revient à chacun, car souvent la coloration, malgré le dépôt de colorants, se complique d'une contraction.

On peut cependant utiliser des solutions aqueuses de certaines matières colorantes, sans grande modification du plastide, ainsi que l'on peut s'en rendre compte par l'examen ci-dessous.

Dimensions de *B. Brunlzii*, exprimées en μ

| | | Longueur Min. | Moy. | Max. | Largeur Min. | Moy. | Max. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Examen à l'état frais : | 1,5 | 1,8 | 2 | 0,5 | 0,65 | 0,75 |
| I | Culture de 24 heures en milieux, S.1. — On ajoute du bleu de toluidine très dilué pour obtenir une teinte à peine perceptible mais suffisante pour montrer les cloisons..... | 1,5 | 1,75 | 2 | 0,5 | 0,64 | 0,72 |
| II | Culture de 24 heures à 35° sur bouillon peptoné. — Examen à l'état frais.. | 2 | 3,2 | 4 | 0,75 | 0,95 | 1,05 |
| III | Culture de 1 mois à 20° sur gélose. — Examen à l'état frais.. | 1,25 | 1,5 | 2 | | 0,5 | |

*Remarque I.* — Les moyennes sont obtenues en divisant par 100 la somme des dimensions de 100 éléments.

*Remarque II.* — Les dimensions indiquées dans le tableau

ci-dessus sont considérées comme s'appliquant à un élément bactérien, mais elles ne correspondent pas toujours à un seul plastide. En effet, à ce stade de développement, nous avons affaire à des plastides en voie de division intense, aussi la cloison n'est-elle pas toujours très visible sur le frais, notamment au § II où les longueurs supérieures à 3 μ correspondent presque toujours à 2 plastides réunis en un seul bâtonnet. Ces réserves faites, il n'en reste pas moins vrai que, cultivé sur milieu peptoné, *B. Bruntzii* a une taille supérieure à celle qu'il présente en cultures sur milieu synthétique.

L'examen sur le frais présente donc l'avantage :

1° De fournir des dimensions exactes des plastides (protoplasme + membrane).

2° De ne faire apparaître aucune déformation de la taille. Par contre on peut cependant commettre des erreurs de mesure en ce qui concerne la longueur, car au premier examen les premières ébauches de la division cellulaire peuvent échapper. Ainsi pour *B. Bruntzii* un examen superficiel nous conduirait aux chiffres suivants :

| Longueur exprimée en μ | | |
|---|---|---|
| min. | moy. | max. |
| 2 | 2,85 | 3 |

alors qu'un examen attentif nous a fourni :

| Longueur exprimée en μ | | |
|---|---|---|
| min. | moy. | max. |
| 1,5 | 1,8 | 2 |

*Remarque.* — La moyenne de 2 μ a été obtenue en divisant par 100 la somme des longueurs de 100 éléments bactériens : 1 μ 5 étant la longueur la plus petite observée et 3 μ la longueur la plus grande constatée.

## Motilité

Le mouvement propre des Bactéries a été étudié par Leeuwenhock. C'est un bon caractère de diagnose des germes à condition de l'étudier dans des conditions nettement définies.

Dans les cultures de *B. Bruntzii* effectuées soit à 37° C, soit à 20° C, soit à 15° C et âgées de huit, douze, vingt-quatre, trente-six et quarante-huit heures, quatre, cinq, six, huit, quinze, vingt jours sur des milieux liquides (bouillon simple, bouillon peptoné, eau peptonée), sur les milieux solides (gélose à 0,5 0/0, 1 0/0, 2 0/0, 3 0/0, gélatine à 10 0/0 et 15 0/0) on n'observe que de faibles oscillations du plastide bactérien.

Les préparations ont été effectuées en interposant entre lame et lamelle des bandes de mica de différentes épaisseurs pour obtenir des couches de liquide d'épaisseur variable. Les préparations ont été examinées sur platine chauffante à 15° C, 20° C et 35° C.

A une seule exception près, il n'a jamais été observé que des oscillations, le plus souvent très faibles, sans mouvement de translation ni de rotation. L'addition de sublimé à 10 0/0 ou d'acide phénique à 5 0/0 permet de constater que les oscillations sont dues à un mouvement brownien et non pas à un mouvement propre du germe.

Une fois cependant, on a observé, dans la préparation, une motilité très vive Certains germes d'abord immobiles paraissaient très animés d'un frémissement courant d'une extrémité à l'autre du plastide. Le plastide bondissait rapidement et progressait en roulant autour de son grand axe et après quelques secondes, s'arrêtait net. La mobilité était de faible durée. En réalité, il s'agissait là d'un mouvement rappelant

celui des Bactéries *monotriches* et non celui des *péritriches*, fait qui aurait immédiatement éveillé l'idée de contamination. Une contamination par un germe monotriche ne prenant pas le Gram et ayant l'aspect de *B. Bruntzii* est un fait possible, quoique cependant beaucoup moins vraisemblable qu'une contamination, par un Bacille péritriche. Bien que l'ensemencement sur gélatine ne nous ait donné que des colonies en montagne de glace, nous ne pouvons affirmer la non contamination de la culture offrant des éléments mobiles (1).

Conclusion : *B. Bruntzii*, à une exception près, a toujours été dépourvu de motilité propre.

Une autre expérience plaidant en faveur d'une certaine mobilité de *B. Bruntzii* est celle relative au chimiotactisme négatif de cette Bactérie vis-à-vis de l'acide phénique.

Le point de départ de cette observation est le fait suivant : Du bouillon, distribué sous une épaisseur de 10 centimètres dans les tubes à essais étroits (8 à 10 millim. de diamètre) avait été ensemencé, puis phéniqué. Or, le hasard voulut que les liquides ne fussent pas mélangés par agitation. Au bout de vingt-quatre heures, nous constations un trouble dans la partie inférieure du tube, tandis que la partie supérieure était limpide. On ne peut expliquer ce fait que par le chimiotactisme négatif du germe vis-à-vis du phénol en solution de concentration convenable, puisque le microbe est aérobie.

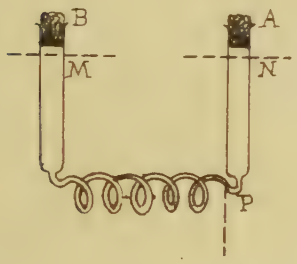
Cette expérience peut être réalisée ainsi : un tube A B stérile est étiré finement à la lampe. La portion étirée de 1 millimètre de diamètre est enroulée autour d'un charbon Berzélius comme l'indique le schéma ci-contre.

1. Il n'est possible en effet d'attribuer une origine unicellulaire à une culture qu'à la condition expresse d'utiliser des méthodes spéciales d'isolement des placides bactériens. (Procédé à l'encre de Chine de Burri, par exemple.)

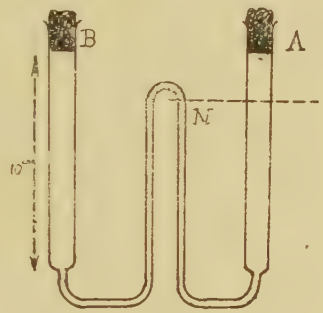
Au bout de vingt-quatre heures à une température de 20° C, le trouble apparaît dans le tube B contenant du bouillon. Ce trouble gagne le tube A si les doses d'acide phénique sont tolérées par le germe.

On peut encore utiliser le dispositif suivant, plus simple :

On ensemence A : au bout de vingt-quatre heures, le trouble apparaît comme précédemment en B.




A est rempli aseptiquement de P à N de bouillon phéniqué.
B est rempli aseptiquement de M à P de bouillon peptoné ordinaire.
On ensemence A avec *B. Bruntzii*.




On se sert d'un tube stérile A B recourbé comme l'indique la figure.
Le tube A contient du bouillon phéniqué jusqu'en N.
Le tube B contient du bouillon ordinaire jusqu'en N.

Il faut prendre la précaution d'éviter les bulles d'air et de ne point déplacer le tube après ensemencement.

Si la végétation apparaît d'abord dans le bouillon peptoné (avec des retards variables de 12, 24, 48 heures dans le bouillon phéniqué) c'est que les germes se sont d'abord éloignés du milieu phéniqué.

Il est évident qu'il y a eu contact entre les deux colonnes et qu'un germe aurait pu se développer dans le bouillon sans que la mobilité jouât un grand rôle. Cependant la vitesse de multiplication est relativement lente pour ce microbe ; de plus la quantité de germes introduits dans le bouillon

phéniqué est petite. On comprend beaucoup plus facilement le fait observé en faisant intervenir la notion d'un chimiotactisme négatif chassant la masse bactérienne vers le milieu non phéniqué.

Dans une autre série d'expériences effectuées à 35° C. pour opérer en milieu liquide, on a rempli la partie spiralée des tubes A B avec de la gélatine à 10 0/0 ou du bouillon gélatiné à 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 0/0. Ensuite on ajoute en A et en B les milieux phéniqués et non phéniqués, on sépare donc les deux colonnes de liquides par une colonne de liquide de viscosité plus grande ; dès que la viscosité est assez grande, ce qui est obtenu avec des milieux gélatinés de 5 à 8 0/0, on n'observe aucun développement dans le bouillon peptoné.

Ali-Cohen étudiant les chimiotactismes des différents sels de K, et de l'asparagine à l'égard des germes typhiques et cholériques a été amené à cette conclusion que les Bactéries n'obéissent au chimiotactisme positif que s'ils sont mobiles.

De ce fait on pourrait donc conclure indirectement à une certaine mobilité de *B. Bruntzii*.

## Fouets

On sait que l'absence de motilité n'implique pas forcément l'absence de fouets moteurs chez un élément bactérien ; car de nombreux facteurs peuvent déterminer l'immobilité d'un plastide pourvu d'organes moteurs.

Il est des cas où les germes peuvent paraître *spontanément* tantôt mobiles, tantôt immobiles ; tel serait par exemple le cas de *Micrococcus agilis de* Ali-Cohen. Nous ne parlerons pas ici de la perte de motilité temporaire que peuvent présenter

certains germes comme le Colibacille cultivé à 42° C. en milieu phéniqué. Ce germe en effet recouvre sa motilité lorsqu'on le réensemence sur les milieux de cultures normaux.

L'immobilité des fouets peut être réalisée : par des agents physiques, tels que le froid (Lehmann et Fried, 1903), la chaleur (comme on le constate pour certains échantillons de Colibacille portés à température de 46° C.), la viscosité du milieu nutritif (obtenue par addition de gélatine ou de gomme) (Ellis, 1902-1903) ; par des agents chimiques, tels que les antiseptiques et notamment l'oxygène. La présence ou l'absence d'oxygène détermine l'immobilité respective de certains aérobies ou de différents anaérobies.

La motilité varie aussi avec le stade d'évolution, avec la morphode considérée ; un exemple nous en est donné par *B. subtilis* qui, au stade sporange, est presque toujours immobile.

De plus certains auteurs et notamment A. Meyer (1912) considèrent comme vraisemblable, l'hypothèse suivante : toutes « les espèces rangées parmi les Bactéries seraient capables de former des fouets » à un stade donné de leur développement. Par contre les fouets pourraient faire défaut à un autre stade de l'évolution du plastide bactérien.

Bien que ce ne soit pas le lieu de discuter cette manière de voir, il nous a paru intéressant de rechercher si *B. Bruntzii* était muni de fouets moteurs. Nous avons utilisé dans ce but des cultures sur gélose effectuées les unes à la température du laboratoire les autres à celle de 35° C. Nous avons opéré comparativement avec des cultures de *B. Bruntzii* et des cultures de Bacille typhique. Tandis que la méthode de Van Ermengem, modifiée par Lasseur, montrait de longs fouets spiralés chez *B. typhosus*, elle ne décelait aucun organe moteur

chez *B. Bruntzii* quelle que soit la morphode examinée De plus les méthodes de Bowhill (1898), Benignetti et Gino (1906) et l'imprégnation argentique de Hollande (1917) ont également donné des résultats négatifs.

## Cytoplasme

Dans l'étude du plastide bactérien, nous emploierons l'expression de cytoplasme dans le sens où le comprennent les Botanistes et les Zoologistes. Nous ne pensons pas devoir faire intervenir les concepts de kinoplasme, trophoplasme de Strasburger (1893-1898), nos connaissances sur les plastides sont encore trop rudimentaires pour que nous soyons autorisés à utiliser d'autres mots que ceux de protoplaste et de cytoplasme. De même, lorsque nous dirons que le cytoplasme est homogène, le mot homogène ne sera pas pris dans le sens des Physiciens, ni même dans celui de la chimie physique, mais dans le sens des Bactériologistes tel qu'ils le conçoivent avec les moyens d'investigation optique qui sont à leur portée.

Si l'on examine dans l'eau ou dans le bouillon le *B. Bruntzii*, provenant de cultures très jeunes, à peine louches, le cytoplasme nous apparaît le plus souvent homogène, mais maintes fois on perçoit des ponts transversaux complètement diffus.

Dans les cultures de vingt-quatre heures effectuées à la température du laboratoire, on observe sur le matériel vivant des ponts de cytoplasme et des espaces plus clairs pour une mise au point supérieure ; tandis que, pour une mise au point inférieure, ils apparaissent plus sombres que le cytoplasme.

Par addition de solution de bleu de méthylène non phéni-

qué ou de solution aqueuse très diluée de bleu de toluidine à du matériel vivant, les vacuoles se montrent comme des plages claires peu ou pas colorées au milieu du cytoplasme coloré de bleu.

Sous l'action de la liqueur iodo-iodurée (addition de I K I à du matériel vivant) les vacuoles sont claires par une mise au point inférieure et jaune foncé jusqu'à brun, par une mise au point supérieure.

On n'observe parfois qu'une seule vacuole chez un individu, mais le plus souvent, on en constate plusieurs et disposées irrégulièrement. Il s'agit probablement de vacuoles de sucs cellulaires.

Dans les plastides plus âgés, on trouve de petites vacuoles disposées irrégulièrement, accompagnant 1 ou 2 grandes vacuoles ; ce sont en général des vacuoles à inclusion, renfermant des grains très chromatiques, parfois métachromatiques.

Un fait assez constant dans les plastides déjà âgés est l'apparition de condensations polaires, qui affectent la forme soit d'un croissant, soit celle d'une sphère ou plus rarement celle de petits grains paraissant rigoureusement sphériques. Ces grains, visibles sur le frais, sont très faciles à percevoir par coloration sur matériel vivant (solution très diluée de bleu de toluidine, de bleu de polychrome, etc.) ou sur matériel fixé par l'acide osmique ou le picroformol alcoolique, ou encore sur les préparations desséchées, fixées à la flamme et colorées soit à l'hématoxyline au fer, soit aux bleus, ou à la fuchsine.

On observe en outre, dans les cellules âgées, une plasmolyse considérable.

## Substances de réserve

### I. — Graisse

Dans de très jeunes plastides (culture de 24 heures) on observe parfois, mais non d'une façon constante, de petites masses (1-2-3) rondes, incolores, très réfringentes. Ces gouttelettes disparaissent en présence de l'acide acétique ; l'hydrate de chloral les rend invisibles (solubilité ? pouvoir réfringent de la solution de chloral ?) ; l'eau de Javel n'agit pas sur elles et la solution de Gram ne semble pas avoir d'action bien précise.

Le soudan III colore ces formations en rouge et le diméthyl-amido-azo-benzol (1) en jaune intense.

Il semble donc qu'il s'agisse de grains de graisse. Cependant, il n'a pas été possible de voir les formations grossir. Au surplus, on ne les retrouve pas dans les plastides âgés.

### II. — Volutine

Dans les cultures âgées de *B. Bruntzii*, principalement dans celles effectuées vers 37° C en bouillon S. I. on observe parfois des grains métachromatiques (grains de volutine) se colorant facilement avec le bleu de méthylène ou le bleu de toluidine (2) ; l'acidité du milieu (due au phosphate acide de potasse) fait virer la solution colorante bleue au rouge et de de ce fait, le cytoplasme se colore en rouge ; c'est là une petite

1. Les plastides vivants ou fixés par le formol sont traités par une solution très diluée de diméthyl-amido-azo-benzol ; la solution mère est une solution alcoolique à 0 gr. 4 o/o.

2. Les conditions dans lesquelles ce travail a été effectué ne nous ont pas permis d'utiliser le bleu métachromatique de Hollande (1916). On sait que ce colorant a donné d'excellents résultats dans l'étude des corpuscules métachromatiques des Champignons.

difficulté technique qui nous oblige à examiner une trace de culture après dilution dans l'eau physiologique.

La production de ces grains de volutine est très irrégulière. Ils sont insolubles dans l'acide picrique, dans l'alcool, l'éther et le chloroforme. Ils sont solubles dans l'hydrate de chloral, dans les alcalis, dans l'eau de Javel, dans l'acide sulfurique à 5 o/o. Une solution aqueuse de bleu de méthylène dilué les colore en rouge ; traités ensuite par l'acide sulfurique à 1 0 0, les grains restent colorés tandis que le cytoplasme se décolore. Dans tous les cas ces formations ne s'observent pas au maximum de l'énergie de croissance comme le voulaient Marx et Woithe (1900-1901) et nous arrivons aux mêmes conclusions que A. Meyer (1901), Ascoli (1901), Krompecher (1901), Gausse (1902), Lasseur (1911). L'étude de ces grains est considérablement gênée par les condensations cytoplasmiques qui sont souvent polaires, en une demi-sphère et c'est pour cette raison que lorsque 2 plastides vont se diviser, on n'observe pas toujours la division d'une façon précise. Mais en faisant varier les mises au point et en colorant très légèrement le plastide, on distingue nettement les deux éléments avec leurs condensations respectives. Certains plastides montrent des grains centraux n'offrant pas de métachromasie et qui sont plus volumineux que les petits grains métachromatiques ; ces gros grains, dont nous parlons, s'observent de préférence dans les vieilles cultures plasmolysées. Ne serait-ce pas là du cytoplasme contracté ?

### III. — Glycogène. Iogène

A côté de ces deux sortes de formations dont nous venons de parler, nous en avons constaté une troisième qui ne se rattache ni à la graisse, ni à la volutine. Nous avons pensé

aux hydrates de carbone et notamment au glycogène et à l'iogène.

Mais à l'aide du réactif iodo-ioduré dilué nous n'avons pas observé de coloration bleue (*iogène*) du plastide bactérien ; de même la solution iodo-iodurée concentrée ne détermine pas l'apparition de la coloration rouge brun ou rouge sombre du *glycogène*. Nous n'avons donc pas décelé d'hydrates de carbone dans les plastides de *B. Bruntzii* et nous n'avons pas pu identifier cette troisième variété de substances de réserves.

## Membrane

Certains Bactériologistes conçoivent la membrane « comme recouverte d'une couche mucilagineuse plus ou moins épaisse, difficilement colorable, et faiblement réfringente » : mais celle-ci n'est pas toujours perceptible par les procédés utilisés dans les laboratoires cliniques. Cela tient uniquement aux techniques employées.

De nombreux procédés ont été indiqués pour la mettre en évidence à l'aide de réactifs tels que le formol-fuchsine, l'iodure de potassium ioduré en solution beaucoup plus concentrée que celle de la formule de Gram, la solution de bleu de toluidine ou de bleu de méthylène très diluée. Le chloro-iodure de zinc, le rouge de ruthérium ne nous ont pas conduits à un aperçu nouveau. L'emploi de l'encre de Chine pour l'étude de cette partie mucilagineuse nous a donné les meilleurs résultats.

L'encre de Chine préconisée par Errera (1906) n'est entrée dans le domaine bactériologique qu'après les travaux de Burri (1909). Si elle n'a pas été utilisée davantage en France, cela tient aux échecs éprouvés par certains expérimentateurs. En effet, tous les échantillons d'une marque « sont loin d'être

identiques ». Burri, Hech, Fruwald (1909) ont indiqué différents procédés d'utilisation de l'encre de Chine. Nous avons adopté la technique suivie par Lasseur dont voici le résumé : l'encre de Chine est étendue de deux à trois volumes d'eau distillée, portée à l'autoclave à 120° pendant vingt minutes pour faciliter la précipitation, centrifugée jusqu'à ce qu'on ait obtenu un culot appréciable (les encres de bonne qualité ne donnent que très peu de sédiment), décantée, distribuée dans des tubes étroits de 0 cm. 5 à 0 cm. 6 et abandonnée au repos un ou deux mois ; au bout de ce temps on décante à nouveau et on la met en ampoules stériles. A l'examen microscopique l'encre ne doit présenter que des grains extrêmement fins. Les encres offrant des grains de taille irrégulière ne sauraient être utilisées. Quelle quantité d'encre de Chine doit-on mélanger à la suspension bactérienne ? On doit théoriquement obtenir un champ sombre où les plastides bactériens paraissent brillants, illuminés. Il faut donc que l'encre soit au préalable diluée de telle façon qu'étendue de son volume de matériel à examiner, elle réalise le fond sombre.

Enfin, on peut lui associer le formol-fuchsine ; Lasseur colore l'émulsion bactérienne au formol-fuchsine, puis il centrifuge, il décante et ajoute une quantité d'eau convenable pour reproduire l'émulsion et mélange ensuite une goutte de cette émulsion avec une goutte d'encre de Chine.

L'emploi de l'encre de Chine seule ou de l'encre de Chine associée au formol-fuchsine ne montre pour *B. Bruntzii* qu'une faible couche mucilagineuse qui n'augmente pas d'une façon appréciable dans les cultures en bouillon de forte concentration salée. Ce fait ne cadre évidemment pas avec l'hypothèse de Gamaleia (1894). Cet auteur pense en effet qu'un plastide bactérien réagirait contre les fortes pressions osmo-

tiques du milieu extérieur par un épaississement de sa membrane.

## Plasmodème

Les formations que nous allons étudier peuvent-elles être homologuées au pont plasmatique inter-cellulaire, aux plasmodèmes de Strasburger (1901) ? L'interrogation subsiste. C'est cependant des plasmodèmes des Champignons et des plantes inférieures que nous pouvons le plus facilement les rapprocher.

En 1888 Koch a montré que « si on laisse dessécher sur une lame de jeunes filaments de *B. tumescens* et si on colore au bleu de méthylène et monte ensuite au baume du Canada, on aperçoit dans le centre de chaque espace intermédiaire une ligne très fine, bleue, qui va d'un filament coloré en bleu jusqu'à l'autre ».

En 1911 Lasseur, étudiant *B. chlororaphis* représente toute une série de types de plasmodèmes, mais cet auteur ne se prononce pas sur la valeur de ces formations. Il faut arriver en 1912 avec A. Meyer pour trouver une étude critique des plasmodèmes (A. Meyer, fig. 22-23).

Au cours de l'étude de *B. Bruntzii*, nous avons recherché la présence de ces formations par la technique suivante : une émulsion bactérienne provenant d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose est fixée par l'acide osmique, puis desséchée et colorée à l'hématoxyline ou bien fixée par la chaleur et colorée à la fuchsine ou bien encore colorée sur le frais au bleu polychrome. On constate que la première ébauche par voie de division s'effectue souvent sous la forme d'anneaux de telle sorte que, durant la croissance, il existe entre les deux plastides récemment isolés une liaison protoplasmique

qui persiste quelque temps. Ainsi observées, ces formations paraissent bien répondre aux ponts du plasma.

Cependant, dans les plastides âgés provenant d'une culture sur bouillon S. L., il n'est pas rare d'observer des formes bactériennes constituées par deux corps arrondis réunis par un mince pont coloré et il ne nous est plus possible d'affirmer que l'isthme soit de nature plasmatique. On n'a plus la sensation que cette formation traverse la membrane et, si on observe les nombreuses figures de plasmolyse présentées par différents plastides, on trouve presque tous les intermédiaires entre les plastides isolés et les plastides réunis. Dans les vieilles cultures la représentation des plasmodèmes paraît donc différente de celle observée dans les jeunes cultures.

## Croissance

Nous ne possédons pas de données précises sur la croissance de *B. Brautzii*, mais sa durée de génération est certainement beaucoup plus longue que celle du Vibrion cholérique et du Bacille typhique. On peut facilement s'en rendre compte en ensemençant simultanément six gouttes d'émulsion, de même concentration, de l'une et de l'autre de ces Bactéries dans des milieux appropriés. Le trouble apparaît beaucoup plus tôt dans les cultures de Vibrion cholérique et de Bacille typhique que dans les cultures du Bacille de l'eau de Laître.

## Formes de repos (Entospore)

Dans les cultures âgées comme dans les cultures jeunes de *B. Brautzii* il n'a jamais été possible d'observer des formes de résistances analogues à celles de *B. anthracis*, *B. subtilis* ou *B. Megatherium*.

Il est à noter que les cultures, tout en conservant leur vitalité pendant des mois et des années sous certaines conditions, ne présentent cependant qu'une résistance très limitée à l'action de la chaleur.

## Coloration du Gram et de Claudius

La coloration ou décoloration des germes par la méthode de Gram fournit un excellent renseignement aux Bactériologistes pour aider à la diagnose de l'espèce. Cependant des contradictions nombreuses sont relevées dans la littérature, c'est ainsi que *B. pyocyaneus*, *B. syncyanus*, *M. meningitidis cerebro-spinalis*, etc..., ont été parfois considérés comme prenant le Gram alors qu'en réalité, ils ne le gardent pas. Cela tient au manque de précision dans le mode opératoire.

Un microbe prend le Gram, lorsqu'après action du violet de gentiane ou du cristal violet et de la solution iodo-iodurée, il reste coloré en violet plus ou moins foncé après action décolorante, pendant un temps convenable, de l'alcool-acétone (Nicolle), de l'alcool absolu, de l'alcool à 95 degrés ou de l'alcool à 80 degrés (Meyer et ses élèves).

Si on effectue une série de préparations avec une culture sur gélose d'un germe X par exemple, on voit que la résistance à la coloration est fonction :

1° De la nature du colorant,

2° De sa concentration,

3° De son temps d'action,

4° De sa température,

5° Du temps d'action et de la concentration de la solution iodo-iodurée,

6° De la nature du décolorant,

7° Du temps d'action de ce décolorant et de la température.

En réalité, tous les microbes se décolorent par la méthode de Gram ; si pour certains d'entre eux le temps de décoloration est de l'ordre de la seconde, comme on le constate pour le Bacille typhique ou les Bacilles paratyphiques, pour d'autres il est de l'ordre de l'heure.

Neide (1904) a étudié la durée de décoloration de quelques germes et il a constaté les résultats suivants :

| Désignation des espèces bactériennes. | Temps nécessaire à la décoloration | |
|---|---|---|
| | Alcool à 90° | Alcool à 80° |
| *B. tumescens* . . . . | 3 heures | 1 heure 20 minutes |
| *B. robur* . . . . . | 3 heures 20 minutes | 1 heure 35 minutes |
| *B. subtilis* . . . . . | 8 heures 30 minutes | 2 heures 10 minutes |
| *B. alvei* . . . . . | 7 minutes | |

Il faut donc substituer à la notion : « *prend le Gram* » ou « *ne prend pas le Gram* » celle de « *durée de décoloration* ».

Sacquépée, s'inspirant des travaux de Grimme (1902), de Neide (1904) et de Brudny (1908) a d'ailleurs repris cette idée dans son travail sur *B. œdématiens*.

Depuis plusieurs années notre camarade E. Schmitt étudie sous la direction de M. Ph. Lasseur la réaction de Gram, mais nous ne pouvons faire état des résultats qui feront l'objet d'un mémoire spécial.

*Essais effectués avec B. Bruntzii*

La solution de cristal violet utilisée est obtenue de la façon suivante : à une solution aqueuse d'acide phénique à 2,5 0/0 on ajoute q s. de solution alcoolique de violet cristallisé pour réaliser une solution à 1 0/0 et une autre à 2 0/0 de matière colorante.

*A*) Une goutte de culture en bouillon peptoné, effectuée à 36° C., âgée de vingt-quatre heures, est étalée sur une lame porte-objet, séchée et fixée par la chaleur, puis on fait agir :

1° Solution phéniquée de violet cristallisé à 1 0/0 : 1 minute à 15° C. ;

2° Solution iodo-iodurée : 1 minute à 15° C.

On lave à l'alcool-acétone à 15° C., on obtient la décoloration en *trois secondes.*

*B*) Une goutte d'une culture en bouillon S I de vingt-quatre heures à 20° C. est étalée sur une lame porte-objet, puis séchée et fixée par la chaleur ; on fait agir ensuite :

1° Solution phéniquée de violet cristallisée à 1 0/0 : 2 minutes à 15° C. ;

2° Solution iodo-iodurée : 2 minutes à 15°C.

On lave à l'alcool-acétone à 15°C., la décoloration est réalisée en *trois secondes.*

*C*) Sur des frottis d'une culture sur gélose à 20° C. et âgée de cinq jours, puis fixés par la chaleur, on fait agir :

1° Solution phéniquée de violet cristallisé à 2 0/0 : 1 minute à 15° C. ;

2° Solution iodo-iodurée : 1 minute à 15° C.

On lave à l'alcool-acétone à 15° C., *quatre à cinq secondes suffisent pour la décoloration.* Notons que, dans les prépara-

tions épaisses, après trois, quatre, cinq secondes de lavage à l'alcool-acétone, il reste souvent quelques plastides non décolorées, mais ce fait est normal, car dans ces types de préparations on trouve toujours des îlots de Bactéries mal décolorées ; nous aurons l'occasion de revenir plus loin sur ce sujet.

*D*) Si l'on part d'une culture sur gélatine âgée de huit jours et en opérant dans les mêmes conditions qu'au paragraphe C, on obtient la décoloration par l'alcool-acétone en *trois secondes*.

Grimme (1902), Neide (1904), Brudny (1908) montrent que les différentes morphoses d'une même espèce offrent des résistances variables à la décoloration ; nous avons observé dans nos recherches le même phénomène avec *B. Brautzii* et nous avons constaté que les plastides qui résistaient le plus à la coloration étaient ceux à cytoplasme dense, peu vacuolaire, mais ces plastides étaient aussi ceux qui se coloraient le plus fortement avec les solutions aqueuses (coloration dite vitale), ou avec les solutions colorantes phéniquées. Ce phénomène mérite d'être signalé, car il est beaucoup plus en concordance avec la théorie physique de Brudny qu'avec l'hypothèse chimique de Unna.

En résumé *B. Brautzii* se décolore rapidement, en quelques secondes, donc il ne prend pas le Gram suivant l'expression couramment employée.

La méthode de coloration de Claudius donne les mêmes résultats que la méthode de Gram.

## CHAPITRE II

## CARACTÈRES BIOLOGIQUES

### Cultures en milieux non chimiquement définis

#### Vitalité

Bien que n'offrant pas de spores, *B. Bruntzii* conserve sa vitalité pendant un temps assez long. Les cultures ensemencées suivant la technique de Lasseur (1913) montrent une belle végétation au bout de dix mois lorsqu'on les remet dans des conditions favorables de développement.

#### Température

Comme tous les germes que l'on isole de l'eau, *B. Bruntzii* commence à se développer à température assez basse vers 8 à 10° C. L'optimum de température est compris entre 20° C. et 25° C.; à 34° C. et 35° C. la végétation est rapide mais la multiplication cesse beaucoup plus tôt qu'à 20° C.-25° C.

A 37° C. le développement est fonction de l'origine de la semence et du milieu ensemencé. La semence provenant de jeunes cultures en pleine végétation pousse bien à 37° C. tandis que celle provenant de vieilles cultures ou de cultures à végétation pénible (cultures sur milieux minéraux dépourvus d'hydrate de carbone) ne produit aucun trouble bactérien sur les milieux de cultures liquides couramment employés. Cependant, bien que le germe ne se développe pas à cette

température, il n'est pas détruit, car placé dans des conditions meilleures de développement (20° C.-28° C.), il se multiplie rapidement et abondamment.

A 39° C. quelle que soit la nature de la semence ou celle du milieu ensemencé ou encore la quantité de semence apportée dans le milieu nutritif, on n'observe aucun développement.

## Aérobiose. — Anaérobiose

*B. Brantzii* ensemencé sur les milieux liquides donne au bout de plusieurs jours un léger voile : cependant ce germe n'est pas un aérobie strict, car il peut se développer dans le canal d'inoculation lorsqu'on l'ensemence sur tube de gélatine. Il y a donc lieu de se demander si *B. Brantzii* n'est pas un anaérobie facultatif.

Dans une première série d'expérience, des tubes effilés contenant du bouillon synthétique sont ensemencés avec *B. Brantzii*, on les relie à la trompe à eau et on les scelle à des pressions différentes.

Dans une deuxième série d'expériences, d'autres tubes reliés à la trompe à eau sont maintenus à 38° C. pour déterminer le départ des gaz et une ébullition du milieu par un vide de 700 millimètres. Quelques tubes sont mis à l'étuve à 36° C. et quelques autres laissés à la température du laboratoire. On a pu constater que *B. Brantzii* peut se développer en présence d'une pression réduite d'oxygène, mais non en l'absence totale de ce gaz. Même après trois semaines, les tubes de la deuxième série n'accusent aucun développement ni à la température du Laboratoire, ni à la température de l'étuve. Mais les germes ne sont pas morts, car si on laisse rentrer l'air préalablement filtré sur tampon d'ouate, le développement se produit et les tubes ne tardent pas à accuser

leur coloration rouge caractéristique. La présence d'oxygène libre est donc indispensable au développement du germe.

## Résistance aux agents physiques

*B. Brantzii* est un organisme très sensible à la chaleur : comme pour les autres Bactéries, sa mort est fonction de la température et de la durée d'action de celle-ci.

Pour effectuer la détermination de la température mortelle, nous avons utilisé des tubes de 1 millimètre de diamètre afin d'obtenir rapidement l'équilibre thermique. Le thermomètre a été accollé au tube de culture comme on le pratique dans la prise d'un point de fusion. La détermination de la température mortelle a été effectuée en partant de suspensions bactériennes de concentration en germe connue mais provenant de cultures sur milieu divers et d'âges différents.

### Première expérience

Chauffage à 37° C. d'une suspension bactérienne de concentration en germes = C. provenant de culture sur bouillon synthétique âgée de dix jours.

Le matériel chauffé est ensuite ensemencé sur milieu synthétique :

| Durée de chauffage | Etat des tubes ensemencés après : | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2 jours | 5 jours | 10 jours | 15 jours |
| 30" | 0 | 0 | trouble | lég. voile col. rouge |
| 1' | 0 | 0 | 0 | trouble col. rouge |
| 2' | 0 | 0 | 0 | trouble col. rouge |
| 3' | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4' | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5' | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6' | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8' | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10' | 0 | 0 | 0 | 0 |

0 = aucun développement.

*Conclusion.* — Dans cette expérience, *B. Bruntzii a été tué à 57° C. au bout de quatre minutes.*

### Deuxième expérience

Chauffage à 57° C. d'une suspension bactérienne de concentration en germes = 4 C provenant d'une culture sur milieu synthétique âgée de dix jours.

Le matériel chauffé est ensuite ensemencé sur bouillon ordinaire :

| Durée de chauffage | État des tubes ensemencés après | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 24 heur. | 48 heures | 3 jours | 4 jours | 6 jours |
| 30" | 0 | trouble | trouble | trouble | trouble |
| 1' | 0 | 0 | trouble léger | trouble | trouble |
| 2' | 0 | 0 | trouble léger | trouble | trouble |
| 5' | 0 | 0 | 0 | trouble léger | trouble |
| 10' | 0 | 0 | 0 | 0 | trouble léger |

Dans cette seconde série d'essais le nombre de germes chauffés étant beaucoup plus considérable que dans la première expérience, tous les germes ne sont pas tués à 57° C, même après dix minutes.

### Troisième expérience

Chauffage à 54° C. d'une suspension dans du bouillon ordinaire. La suspension est effectuée à l'aide d'une culture sur gélose ou d'un fragment de voile provenant d'une culture sur milieu synthétique. Le matériel chauffé est ensuite ensemencé sur bouillon.

I. — Suspension microbienne provenant d'une culture sur gélose.

| Durée de chauffage | Etat des tubes ensemencés après : | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 48 heures | 3 jours | 4 jours | 5 jours |
| 30" | 0 | 0 | léger louche | louche |
| 1' | 0 | 0 | id. | id. |
| 5' | 0 | 0 | 0 | 0 |

II. — Suspension microbienne effectuée à l'aide d'un fragment de voile d'une culture sur milieu synthétique.

| Durée de chauffage | Etat des tubes ensemencés après : | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 48 heures | 3 jours | 4 jours | 5 jours |
| 30" | léger louche | trouble normal | trouble | trouble |
| 1' | 0 | 0 | trouble | trouble |
| 5' | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Conclusion : à 54° C.*, le Bacille provenant de culture sur gélose ou sur milieu synthétique *est tué en cinq minutes.* L'origine de la semence ne paraît donc pas avoir une grande importance sur la résistance du plastide à la chaleur.

Nous avons en outre déterminé la température mortelle sur des cultures âgées de deux mois sur gélose, sur bouillon et sur milieu synthétique. Tous les éléments microbiens sont tués à 60° C. en une minute. Nous sommes donc autorisés à penser que ce germe ne présente pas de formes de résistance.

La détermination des zones de température mortelle de E. Duclaux avec des émulsions de concentration différentes donne des résultats comparables à ceux obtenus par Mamelle (1919) dans l'action du chlorure de sodium sur *B. pyocyaneus erythrogenes.*

## Point osmotique de Guillemard

L'action des sels alcalins sur les Bactéries a fait l'objet de très nombreux travaux, mais ce n'est qu'assez récemment que l'on a songé à utiliser, pour la diagnose de l'espèce, la réaction de chaque Bactérie à l'égard de solution saline de concentration déterminée.

En 1908, Guillemard montre que l'addition de sel neutre dans les bouillons de culture pouvait servir à différencier des Bactéries voisines jouissant de propriétés communes.

En 1909, l'auteur généralise ses conclusions. Il définit le « *point osmotique* » d'un germe en établissant la concentration limite de la solution d'un sel neutre à laquelle le germe végète. C'est un moyen de différenciation des microorganismes qui doit prendre place à côté des autres caractères biologiques.

Raphael Dubois, en 1910, fait un rappel de priorité, car il a constaté le fait avant Guillemard, ce qui n'enlève rien au mérite des deux auteurs. D'ailleurs, il est juste de rappeler que la priorité reviendrait plutôt à J. Massart qui déjà en 1889 fait intervenir la notion osmotique. Mamelle en 1919 précise l'importance du nombre de germes dans la détermination du point osmotique.

Dans nos recherches sur la réaction de *B. Bruntzii* aux solutions salines, nous avons ensemencé ce germe dans une série de matras renfermant chacun 100 centimètres cubes de solution de peptone avec des doses croissantes de chlorure de sodium ; ces doses variaient de 0 gr. 50 à 10 grammes pour 100 centimètres cubes de liquide nutritif.

Les essais ont été effectués à la température du laboratoire

et nous ont conduits aux constatations suivantes : après *quarante-huit heures*, l'intensité du trouble bactérien va en décroissant dans les matras contenant de 0 gr. 50 à 5 grammes de chlorure de sodium. Pour une teneur en chlorure variant de 6 0/0 à 8 0/0 le liquide reste limpide mais offre un dépôt visible; avec une teneur en chlorure supérieure à 8 0/0 il n'y a pas de dépôt sensible.

En somme, avec une concentration en chlorure de sodium de 6 0/0 il y a végétation, mais les Bactéries sont très rapidement sédimentées et l'agitation, au lieu de montrer un dépôt filamenteux, laisse voir de nombreux petits flocons qui paraissent des agglutinats de Bactéries, ce qui est d'ailleurs confirmé par le microscope.

Avec une concentration en chlorure de sodium de 8 0/0, bien que très faible, la végétation persiste. En effet on peut vérifier ce fait : 1° par l'examen microscopique du dépôt et 2° par la numération des germes après ensemencement sur gélatine.

En résumé, il y a une diminution rapide du nombre de germes à mesure que le taux de chlorure de sodium s'élève dans le milieu nutritif, mais il persiste un petit nombre de germes, grâce à « l'adaptation des cellules plus aptes ».

## Action de l'acide phénique

Les colonies sur gélatine de *B. Brantzii* pouvant être confondues avec celles du Colibacille ou du Bacille typique, nous avons étudié l'action de certains antiseptiques et notamment celle de l'acide phénique à l'égard de ce germe.

I. *Essais effectués à la température de 36°,C*

| *B. Bruntzii* ensemencé sur bouillon phénique à : | Caractères des cultures après : | | |
|---|---|---|---|
| | 24 heures | 48 heures | 5 jours |
| 1 0/00 | liquide limpide | liquide limpide | liquide limpide |
| 0,75 0/00 | id. | id. | id. |
| 0,50 0/00 | id. | id. | id. |
| 0,25 0/00 | légèrement louche | légèrement louche | trouble normal |

II. *Essais effectués à une température variant de 15° à 20°,C*

| *B. Bruntzii* ensemencé sur bouillon phéniqué à : | Caractères des cultures après : | | |
|---|---|---|---|
| | 24 heures | 48 heures | Cinq jours |
| 1 0/00 | trouble normal à la partie inférieure ; | trouble uniforme | trouble uniforme |
| 0,75 0/00 | limpide à la partie supérieure (1) | id. | id. |
| 0,50 0/00 | trouble normal | id. | id. |
| 0,25 0/00 | id. | id. | id. |

Ce fait nous permet de rappeler le chimiotactisme négatif de *B. Bruntzii* vis-à-vis de l'oxybenzène que nous avons démontré antérieurement. En ce qui concerne la série de

1. A la température du laboratoire pour des doses d'acide phénique de 1 gramme et 0 gr. 75 0/00 on constate au bout de vingt-quatre heures, un trouble à la partie inférieure des tubes, alors que la partie supérieure du tube reste limpide. Ceci est dû probablement à la diffusion lente de l'acide phénique.

Dans cette série, l'acide phénique avait été ajouté aseptiquement aux tubes de bouillon ; mais en réalité, le mélange avait été mal fait. Si en effet on réalise l'agitation en mélangeant par aspiration dans une pipette à boule que l'on scelle et que l'on ouvre après agitation, le mélange est parfait. Ce milieu phéniqué, ensemencé avec *B. Bruntzii* montre une végétation retardée de douze à vingt-quatre heures avec des doses d'acide phénique variant de 0 gr. 75 à 1 gramme 0/00.

tubes ensemencés en milieu phéniqué et mis à l'étuve à 36° C. nous avons constaté ce qui suit :

Après six jours d'étuve, les tubes sont remis à la température du laboratoire ; vingt-quatre heures après le tube phénolé à 0,50 0/00 accuse un trouble égal à celui phéniqué à 0,25 0/00 ; le neuvième jour le tube phéniqué à 0,75 0/00 se trouble et le dixième jour le trouble apparaît dans le tube carbolé à 1 0/00.

Donc, à 36° C. *B. Bruntzii* n'a pas été tué par l'acide phénique après un contact de cinq jours. En outre, le phénol ne semble pas avoir déterminé de modifications morphologiques du plastide bactérien.

En résumé le Bacille isolé de l'eau de Laître et les Bacilles du groupe Coli-typhique réagissent de façon différente sous l'action de l'acide phénique.

## Cultures sur gélatine

Un caractère très important dans le diagnose de l'espèce c'est la forme de la colonie sur les différents milieux de culture.

En feuilletant les travaux des Bactériologistes on est frappé du soin avec lequel ils se sont attachés à décrire la forme des colonies microbiennes, leurs dimensions, leurs couleurs, leur mode de développement, etc...

Serkoswki (1898) voit dans chaque colonie un point essentiel : le *noyau*, qu'il considère comme « l'organe essentiel de chaque colonie, qui n'est presque jamais absent ».

Ce « *noyau* » est situé tantôt au centre de la colonie, tantôt il occupe une partie excentrique (exemple : les colonies de Bactérium coli commune). Il n'est perceptible le plus sou-

vent qu'à la loupe ou au microscope, mais parfois on le perçoit à l'œil nu. Cette formation n'est pas une masse sans structure et cette dernière peut être d'ailleurs assez compliquée et différente pour chaque espèce. C'est précisément dans le noyau qu'à lieu la multiplication des éléments.

Hutchinson (1907) rappelle l importance que Migula (1897-1900) dans son *Système des Bactéries* attribue à l'aspect des colonies sur agar. D'après lui, presque toutes les Bactéries mobiles donnent des colonies qui ont la forme d'un dépôt large, peu caractéristique, tandis que les immobiles donnent des cultures en strie étroite.

Le même auteur constate que dans les milieux très concentrés les germes se développent en colonies beaucoup plus petites que sur les milieux moins concentrés.

Lehmann et Neumann (1913) considèrent la liquéfaction ou la non liquéfaction de la gélatine comme un élément accessoire de la diagnose bactériologique.

Pour ces auteurs il est « très regrettable que l'un des moyens les plus commodes de diagnostic bactériologique « la liquéfaction de la gélatine » ait perdu presque toute sa valeur », p. 59. Deux faits dominent l'argumentation de Lehmann et de Neumann : 1° le pouvoir liquéfiant varie chez les espèces dites liquéfiantes ; 2° on peut, à l'aide de procédés spéciaux, mettre en évidence le pouvoir protéolytique chez des germes considérés comme non liquéfiants.

Au premier argument nous répondrons qu'il faudrait avoir une singulière conception des fonctions du plastide bactérien pour conclure *à priori* que la liquéfaction de X tubes de gélatine par différentes souches d'une même espèce bactérienne doive être identique. Ce serait la négation de la variabilité : Variabilité constatée dans toutes les fonctions bactériennes depuis la fonction de fermentation jusqu'à celles des pouvoirs

chromogène et pathogène. Qu'il nous suffise de rappeler à cette occasion les variations du pouvoir chromogène observées par Schottelius (1888), Wasserzug (1887-1888), Laurent (1890), Lasseur (1911), Gessard (1919), Mamelle (1920), etc. ; les variations du pouvoir agglutinable Nicolle et Trenel (1902), Remy (1900), Sacquépée (1901), Bordet (1910), etc. ; l'influence de la semence sur les fermentations : Pasteur (1876), Perdrix (1891), Grimbert (1893), etc. (1).

Quelles que soient les modifications chimiques profondes du milieu ou les modifications physicochimiques auxquelles est liée la liquéfaction de la gélatine, on conçoit fort bien que certains facteurs, tels que la nature de la gélatine utilisée, la concentration en gélatine, la température à laquelle le germe réagit sur le milieu, les quantités variables d'électrolytes interviennent dans le processus de liquéfaction et puissent dans une certaine mesure en modifier l'allure, sans pour cela lui enlever sa signification biologique.

Il ne faut pas attacher une trop grande importance aux faits mêmes relatés par Lehmann et Neumann ; d'ailleurs ces auteurs citent le cas de deux échantillons de « Vibrions phosphorescents dont l'un liquéfiait d'abord très lentement la gélatine puis, après un temps de culture plus long, la liquéfiait de plus en plus rapidement, tandis que l'autre échantillon se comportait d'une façon directement opposée ». Ce fait ne nous surprend pas, car nous savons que le type de l'espèce qui représente le produit de l'adaptation à des conditions de vie déterminées se maintient dans le milieu auquel il est adopté ; mais, si les conditions de milieu changent, et c'est le cas réalisé dans l'expérience de Lehmann et de Neu-

1. En ce qui concerne la virulence, nous nous bornerons à rappeler la phrase de Vincent (1898). « De toutes les propriétés que possèdent les microbes pathogènes, la virulence est peut-être la plus instable... »

MANN, les formes préadaptées au milieu attaqueront plus facilement le substratum nutritif que celles dont l'adaptation est moins marquée. Dans les laboratoires, on réalise tous les jours des adaptations progressives de tel ou tel germe, en « l'entraînant » à vivre sur tel ou tel milieu.

La deuxième objection de LEHMANN et de NEUMANN, implicitement contenue dans leur travail, s'applique à la propriété protéolytique que peuvent présenter les germes non liquéfiants. Il est parfaitement exact que des Bacilles ne liquéfiant pas la gélatine à 15° C. peuvent néanmoins secréter des ferments protéolytiques à 37° C. Pour vérifier ce fait, la technique de H. DE WAELE et A. VANDEVELDE (1905-1909) bien qu'imprécise, est recommandable, car elle est incontestablement supérieure à celle de MALFITANO et ses élèves (1900-1905-1907), etc...

En effet, l'emploi de tubes calibrés remplis du gel protéique à étudier ne réalise pas un contact assez parfait entre la substance à attaquer et l'enzyme protéolytique; la diffusion des colloïdes est trop faible, et l'erreur dans la détermination du pouvoir protéolytique sera par suite d'autant plus grande que le pouvoir protéolytique du germe sera plus élevé.

Le chiffre obtenu pour les germes non liquéfiants est donc trop élevé par rapport à celui trouvé pour les germes liquéfiants. Cette réserve faite, nous pouvons parfaitement reconnaître que les ferments protéolytiques peuvent exister chez toutes les Bactéries et qu'il n'y a qu'une différence d'ordre quantitatif pour une enzyme donnée (1). C'est d'ailleurs là un

1. Contrairement à l'hypothèse de H. DE WÆLE et de VANDEVELDE, LAUNOY (1919) et GESSARD (1920), démontrent soit directement, soit indirectement que l'enzyme protéolytique secrétée par chaque Bactérie est rigoureusement spécifique et nous avons dans la méthode de LAUNOY un moyen de diagnose de l'espèce des plus intéressants.

fait d'ordre général. Rappelons à cet effet l'exemple des fermentations des sucres : on dit souvent qu'un germe ne fait pas fermenter tel ou tel sucre, ce qui n'implique pas l'idée que l'hydrate de carbone considéré ne soit pas attaqué. En effet un germe attaque souvent l'élément hydro-carboné mis à sa disposition, mais il n'y a pas production d'acide, ou bien encore l'acide formé est neutralisé au fur et à mesure de sa production, ou enfin, la quantité d'acide est trop faible pour être mise en évidence par l'indicateur utilisé.

Quoi qu'il en soit, toutes ces considérations ne sauraient en aucune façon diminuer la valeur du caractère de liquéfaction de la gélatine au cours de l'étude d'un germe.

*B. Bruntzii*, ensemencé soit en piqûre, soit en plaque sur gélatine, bouillon (alcalinisée à 0 gr. 25 de soude par litre titrage effectué en présence de phénolphtaléine) ne produit aucune liquéfaction de ce milieu. Il en est de même après trois semaines de culture sur des milieux renfermant 10, 12 et 15 grammes de gélatine 0/0.

Un tube de gélatine ensemencé, mis à l'étuve à 35° C, après quatre jours de culture se solidifie par refroidissement à 15° C. Il aurait été intéressant d'effectuer la même expérience avec des milieux de teneurs en gélatine décroissantes.

**A. Colonies superficielles sur plaques de gélatine à 15 0/0**

*Forme des colonies.* — Le type de colonie le plus fréquemment observé est la colonie « *en montagne de glace, en feuille de vigne* » rappelant celle du Bacille typhique et des germes voisins. A côté de ces colonies, on peut en observer d'autres plus amincies, opaques. C'est le deuxième type sur lequel nous aurons l'occasion de revenir. On observe d'ailleurs des

faits analogues avec le Colibacille ou le Bacille pyocyanique lorsque ce dernier germe est cultivé sur gélose. Nous allons étudier successivement les deux types de colonies de *B. Bruntzii* cultivé sur gélatine.

*Premier Type. — Colonies en feuille de vigne*

Après neuf jours de culture, la colonie mesure 6 à 10 millimètres de diamètre : elle est transparente, bleutée, avec un centre de végétation jaunâtre. Les bords sont lobés, et les lobes dentelés. La colonie présente de nombreux sillons.

*Développement de la colonie* :

a) *Colonies peu espacées* : *après vingt-quatre heures*, les colonies sont très nombreuses (Pl. II, fig. I), elles mesurent 0.3 millimètre environ de diamètre et présentent une zone périphérique finement radiée, à bord entier ou légèrement denté.

Une zone interne uniforme et une masse ronde jaunâtre, centrique ou excentrique constitue le « *noyau* » de Serkoswki.

*Après quarante-huit heures de culture* (Pl. II, fig. II), la colonie présente deux zones ; l'une périphérique, transparente, et l'autre centrale, jaune opaque, qui offre l'aspect d'un bouton plus ou moins vallonné, avec des crêtes plus ou moins marquées. La colonie mesure environ 0,5 millimètre de diamètre.

*Après cinquante-six heures de culture* (Pl. II, fig. III), la colonie atteint environ 0,6 millimètre de diamètre dans laquelle le bouton central est devenu très opaque, jaune, difficile à distinguer ; on ne perçoit plus le « *noyau* ». La zone cen-

trale n'augmente pas sensiblement de diamètre. mais croît en hauteur. De plus, commence à apparaître la zone transparente qui va grandir ; mais, même après plusieurs jours, cette zone transparente sera relativement pue importante si on la compare à celle des colonies espacées.

b) *Colonies espacées : après vingt-quatre heures* de culture (Pl. II, fig. IV), les colonies plates mesurent 0,3 millimètre de diamètre environ, leur structure est uniforme, elles sont à grains très fins, transparentes, à bord légèrement lobé, et présentent une masse excentrique jaune.

*Après trente-six heures*, la taille augmente et la dentelure se dessine plus nette (Pl. II, fig. V).

*Après quarante-huit heures*, les colonies transparentes mesurent environ 0,4 millimètre à 0,5 millimètre ; elles sont plates et présentent plusieurs crêtes d'où partent de nombreux sillons se dirigeant vers la périphérie ; les bords sont très dentelés (Pl. II, fig. VI).

*Après trois jours de culture* (Pl. II, fig. VII), les colonies atteignent 1 mm. 8 à 2 millimètres. Elles sont plates, transparentes, à bords profondément dentelés, avec une masse surélevée centrique ou excentrique et dont la coloration varie du jaune au brun. Ces variations de colorations sont dues à l'enroulement hélicoïdal de ces masses, comme on peut s'en rendre compte en observant des colonies plus âgées, qui laissent voir un petit bouton superficiel. De cette partie centrale se dirigent vers les lobes ou lobules des crêtes sinueuses et des *vallées* s'épanouissant à travers la partie transparente, réfringente ; en outre ces crêtes et ces vallons sont sillonnés de fins canaux : ce sont les « voies de communication » dont parle Serkoswki et qui, d'après cet auteur, interviendraient dans la nutrition de la colonie. C'est un point que nous n'avons pas eu l'occasion de confirmer. Mais nous pouvons ajouter

que MM. Vuillemin et Lasseur ont observé des faits analogues à ceux signalés par Serkoswki (communication orale).

*Deuxième type. — Colonies opaques.*

*Après vingt-quatre heures* de culture, ces colonies mesurent 0,3 millimètre environ de diamètre, elles présentent une masse centrale granuleuse, colorée légèrement en jaune, et une partie périphérique homogène, transparente, qui diminue au fur et à mesure de l'accroissement de la colonie, pour finir par ne plus être qu'un mince anneau circulaire, assez régulier, tandis que la partie centrale se fonce de plus en plus.

Il semble que les germes entravés dans leur déplacement et ne pouvant suivre une direction centrifuge se développent en hauteur. On peut objecter à cette hypothèse les conceptions de certains auteurs (Duclaux, Gotslich in Kolle et Wassermann) qui admettent que normalement le développement s'effectue au bord de la colonie. C'est là une manière de voir qui n'est pas irréfutablement démontrée.

Nous avons vu quelle importance Serkoswki attribue au *noyau* qu'il considère comme le centre de multiplication de la colonie ; ce serait en quelque sorte une colonie mère à énergie de croissance considérable. *A priori*, rien ne paraît le justifier. En effet, autant qu'il est possible d'en juger par la littérature spéciale consultée à ce sujet, une colonie se compose de petites colonies élémentaires dont les plastides paraissent avoir dans l'ensemble les mêmes caractères. Il existe évidemment des variations de plastides à plastides, mais ces variations ne sont pas considérables. Il nous a paru intéressant de rechercher si l'asymétrie de la colonie était en relation avec l'excentricité du noyau de multiplication : nous

avons noté le même pourcentage de colonies asymétriques offrant un noyau excentrique que de colonies asymétriques offrant un noyau centrique. Il n'y a donc pas de règle générale ; de même la symétrie du noyau ne correspond pas toujours à la symétrie de la colonie et inversement. Par contre les colonies symétriques plates, peu vallonnées, ont en général un noyau très petit. Il ne nous a donc pas été donné d'observer de relations étroites entre le *noyau* de Serkoswki et la forme de la colonie. Si le *noyau* fait rarement défaut dans la colonie, il présente en revanche de fréquentes variations de coloration, de structure et de taille.

Dans le tableau suivant sont indiquées les dimensions comparatives du noyau et de la colonie.

| | NOYAU | | COLONIES | OBSERVATIONS |
|---|---|---|---|---|
| | Petit axe | Grand axe | Diamètre | |
| A | 0,08 | 0,1 | 2 | |
| B | 0,05 | 0,08 | 2 | |
| C | 0,08 | 0,15 | 3 | |
| D | 0,1 | 0,13 | 1 | |
| E | 0,1 | 0,2 | 0,7 | Colonies très espacées. |
| F | 0,1 | 0,16 | 1,38 | |
| G | 0,013 | 0,014 | 3 | Colonies très plates, pas ondulées, à bords lobés. |
| H | 0,125 | 0,0250 | 2,5 | |
| I | 0,025 | 0,038 | 2 | Colonies fortement vallonnés, à bords lobés et dentelés. |

Il résulte de l'examen de ce tableau :

1° que des colonies de même diamètre peuvent présenter des *noyaux* de taille différente (Exemple : colonies A. B. I.)

2° Une colonie de 3 millimètres (G) peut renfermer un *noyau* plus petit qu'une colonie de 2 millimètres (A).

Il n'y a pas de relation simple entre le diamètre du noyau et celui de la colonie.

La taille du *noyau* ne nous apportant aucun élément nouveau d'appréciation, étudions maintenant le développement de cette masse interne.

Dans les colonies jeunes de *B. Bruntzii* de quarante-huit heures à trois jours suivant les cas, le « noyau » se présente au début sous la forme d'une masse elliptique ou ovoïde, plus rarement sphérique ; sa structure est homogène, sa couleur jaunâtre et parfois blanchâtre. Au bout d'un temps variant de quelques heures à un ou deux jours, il se détache de cette masse une deuxième formation apparaissant dans sa partie libre sous la forme d'un croissant. Cette masse fille reste accolée à la masse primitive et augmente de taille avec le système. Il semble donc qu'il y ait eu une division qui se soit effectuée suivant le grand axe. Dans les colonies plates, « le noyau » atteint rapidement sa taille définitive, mais il n'en est pas de même dans les colonies en feuilles de vigne, où toute la masse centrale à structure lisse et à coloration jaunâtre est vraisemblablement une dépendance du centre primitif du « noyau ». Peut-on espérer tirer de l'étude du « noyau » un caractère de diagnose? Pour répondre à cette question, il serait nécessaire d'étudier comparativement à ce point de vue un assez grand nombre d'espèces microbiennes. En ce qui concerne *B. Bruntzii*, nous n'avons trouvé ni dans la taille, ni dans la couleur aucun caractère bien fixe. Il est possible cependant que les variations observées soient assez

limitées pour permettre à cette formation de conserver une certaine valeur.

*Structure.* — Dans les cultures trop épaisses, il est impossible de distinguer les deux parties périphériques. On ne voit qu'une série delignes pointillées ou plutôt de lignes parallèles constituées par une succession de petites masses.

*Préparation par impression.* — Les préparations par impression montrent des amas irréguliers, à arrangement le plus souvent parallèle.

Lorsqu'on examine au microscope un fragment de colonie un peu dissocié, on constate que les lignes parallèles sont formées d'une succession de masses qui correspondent aux lignes parallèles radiales, périphériques signalées, plus haut. Une détermination exacte aurait pû être donnée par des coupes; malheureusement nous n'avons pas eu en mains les moyens matériels nécessaires pour en faire.

### Conditions d'obtention des colonies plates opaques et des colonies en feuille de vigne

Sur gélatine à 15 0/0, 95 pour cent les colonies sont transparentes et en feuille de vigne, tandis que sur gélatine à 10 0/0, ce sont les colonies opaques qui prédominent. Le fait a été vérifié plusieurs fois, et la concentration du milieu a toujours agi dans le même sens. L'examen microscopique d'une colonie opaque et celui d'une colonie transparente montrent les mêmes formes bactériennes ; ensemencées sur milieu S. I., celles-ci sont productrices du même pigment, nous avons donc affaire au même germe. Toutefois, les colonies transpa-

rentes donnent en général des cultures plus rapidement colorées, à voile beaucoup plus mince et réduit souvent à une fine pellicule. Nous ne pouvons admettre que depuis quatre ans, nous travaillions avec une culture mixte, car si après de multiples passages sur plaques il n'est pas possible de considérer une culture comme ne renfermant pratiquement qu'une seule espèce bactérienne, autant renoncer à l'obtention des cultures pures. Par suite, il nous semble que nous sommes en droit de considérer deux sortes de colonies, l'une *typique*, l'autre *atypique* et que l'apparition de la colonie atypique est favorisée, mais non pas déterminée exclusivement, par le milieu.

Il est évident que si l'aspect et la structure des colonies dépendaient uniquement des agents extérieurs, il serait toujours possible, par l'emploi de milieux déterminés, de ramener toutes les espèces bactériennes au même type de colonie et inversement, on pourrait obtenir avec une même espèce toute la gamme des colonies. Les faits contredisent cette hypothèse.

### B. — Colonies se développant dans l'intérieur de la gélatine

Les colonies se développant dans un milieu solide (gélatine, gélose atteignent en général des dimensions petites comparativement à celles des colonies superficielles. Les colonies enfermées dans un milieu solide sont nécessairement soumises à la pression de ce milieu et suivant que les forces sont égales ou inégales dans les trois plans de l'espace, on observe des colonies sphériques ou lenticulaires. Avec *B. Bruntzii* on observe sur gélatine des colonies tantôt cordiformes, tantôt lenticulaires, tantôt sphériques. Il est évident que, sous le nom de colonies sphériques, nous ne comprenons pas les colonies lenticulaires verticales ou obliques qui

n'ont de circulaire que leur projection. Cette confusion a été commise assez souvent, pour que nous nous permettions de définir ce que nous désignons par colonie sphérique.

*Colonies lenticulaires.* — Après trois jours de culture, les colonies ont l'aspect de deux verres de montre accolés, mesurant 0 mm. 5 à 0 mm. 25. Par une sorte de clivage, les colonies en vieillissant donnent naissance à une seconde masse restant accolée à la première. Les divisions peuvent se répéter plusieurs fois, mais, en général, toujours dans le même plan. La colonie croît peu en vieillissant.

*Colonies cordiformes.* — Entre les colonies lenticulaires et les colonies sphériques, nous avons constaté des colonies cordiformes, présentant tantôt l'aspect d'un cœur régulier, tantôt celui d'une colonie lenticulaire qui serait sectionnée par un plan perpendiculaire au grand axe.

*Colonies sphériques.* — Ces colonies s'observent fréquemment dans les couches les plus voisines de la surface. Leurs dimensions sont en général supérieures à celles des colonies lenticulaires des couches profondes. *Après trente-six heures* de culture, les colonies atteignent 0 mm. 25, à bords échancrés, d'où partent des lignes se dirigeant vers le centre de la colonie.

Au bout de *quatre jours* de culture les colonies mesurent 0 mm. 5 avec des bords découpés ; la masse se fragmente suivant une série de diamètre.

Après *cinq jours* de culture la grandeur des colonies est de 0 mm. 6 à 0 mm. 7. Les colonies peuvent subir des modifications : elles sont alors jaunes plus ou moins foncé, grenues et la masse centrale en occupe les 9/10. On peut aussi apercevoir vers le quatrième ou le cinquième jours une auréole périphérique, transparente, avec des lignes radiales, analogues aux nervures des colonies superficielles.

*Cultures sur gélatine en piqûre.* — Ces cultures ne sont pas caractéristiques. *B. Bruntzii* donne au bout de cinq jours une culture en surface plate ou légèrement bombée sur un diamètre de 4 à 5 millimètres. Le germe se développe assez abondamment dans le canal d'inoculation, offrant le type de culture en *tête de clou*. La gélatine n'est pas liquéfiée. Les ensemencements ont été effectués sur des bouillons neutres, additionnés de gélatine dans les proportions de 10, 12, 15, 20 0/0.

### Cultures sur gélose

Les milieux utilisés sont des bouillons peptonés additionnés de gélose dans les proportions de 1,5 0/0, 2 0/0 et 3 0/0 et neutralisés. Les cultures de *B. Bruntzii* sur ces milieux sont peu caractéristiques.

*Ensemencement en strie.* — A la température du laboratoire, la strie d'ensemencement reste toujours très étroite.

Ce fait plaide en faveur de l'absence de motilité du germe (En général les germes mobiles donnent des cultures larges tandis que les Bactéries immobiles donnent des stries étroites). Au quatrième jour, les cultures sont transparentes, bleutées, minces, brillantes, humides. En vieillissant, elles deviennent un peu blanchâtres, perdant de leur transparence, mais ne sont jamais jaunes, opaques, plissées. Elles sont toujours *unies* et *visqueuses*.

### Cultures en bouillon simple

*B. Bruntzii* ensemencé sur bouillon neutre et à la température de 35° C. donne au bout de *vingt-quatre heures* un trouble intense avec un léger dépôt. Une collerette, réunie par de

fins trabécules à un délicat réseau, s'étend sur la partie centrale du liquide. Au bout de *quatre jours*, le trouble persiste, la collerette est plus visible, on aperçoit une mince pellicule ou un voile très fragile tombant au fond du tube au moindre choc. Au bout de treize jours, le trouble subsiste ; la pellicule ou le voile et souvent la collerette sont tombés au fond du tube, laissant voir un fragment de voile comme dépôt. Les cultures ne présentent pas d'odeur caractérisque, elles sont *incolores* et visqueuses.

### Cultures sur eau peptonée

Sur eau peptonée à 3 0/0, neutralisée, le développement de *B. Bruntzii* dans son ensemble est comparable à celui observé en bouillon simple, mais beaucoup moins abondant. De plus on observe sur les parois des tubes une infinité de petits grains dus à une précipitation plus hâtive des corps microbiens. La culture est *incolore*.

### Cultures sur pomme de terre glycérinée

Lorsqu'on ensemence avec *B. Bruntzii* un assez grand nombre de tubes de pomme de terre que l'on abandonne à la température du laboratoire, tantôt on obtient des cultures gris brunâtre, peu visibles, légèrement humides et brillantes sur le bord du tubercule, tantôt des cultures (et c'est la majorité des cas variant du jaune pâle au jaune citron. Enfin, on peut observer une coloration rosée plus ou moins discrète et qui est dans la masse jaunâtre, cette coloration rosée siège généralement à la partie supérieure du tubercule. Examinées à la loupe ces cultures se montrent formées d'une infinité de petits grains, extrêmement délicats, visibles surtout dans les cul-

tures colorées. Il en résulte que la même colonie peut laisser voir par place une succession de petits grains jaunes et roses. On doit noter que la coloration rose ne s'observe que très irrégulièrement.

Les cultures sont toujours très minces et jamais plissées.

### Cultures sur pomme de terre non glycérinée

Les cultures sont gris sale ou gris brun.

*Remarque.* — Nous verrons plus loin que le fer est indispensable à la production de pigments rouges et par là s'explique l'irrégularité de la coloration sur pomme de terre. Il suffit, en effet qu'au cours de la préparation de ce milieu il se trouve une trace de fer pour que celui-ci fournisse plus tard des cultures à pigment rose.

### Cultures sur carotte

Les cultures sur carottes sont peu caractéristiques. de plus la végétation est très faible.

### Cultures sur sérum coagulé

Sur sérum coagulé, tant à la température de 35°C. qu'à celle du laboratoire, on obtient toujours une culture mince, incolore, à peine visible. *B. Bruntzii* n'a pas d'action sur le sérum.

### Cultures sur ascite

Cultures incolores. Légères pellicules à la surface.

### Cultures sur lait

Le lait n'est pas coagulé, ni peptonisé. Les ensemencements ont été faits sur lait entier stérilisé à 105° C. pendant vingt minutes.

Après quinze, vingt, trente jours à température du laboratoire, le lait n'est pas modifié, il garde sa couleur s'il est ensemencé avec une trace de culture sur gélose ou bouillon. Cependant, si on effectue l'ensemencement plus largement avec une anse de 4 à 5 millimètres ou à l'aide d'une pipette (I goutte par exemple) à partir d'une culture en bouillon synthétique, les séries de tubes offrent une teinte rosée, qui n'est d'ailleurs nettement perceptible qu'en comparaison avec des témoins non ensemencés. C'est le seul fait qui traduise la végétation de *B. Bruntzii* dans le lait. A 37°C le lait n'est pas coagulé même après quinze ou vingt jours.

Je crois devoir relater le fait suivant : dans un essai effectué avec du lait fourni par une formation sanitaire on a observé la coagulation au bout de quinze jours. Le lait utilisé n'avait pas l'aspect de lait entier ; au goût, il n'en avait pas les caractères organoleptiques et la stérilisation n'avait pas donné d'anneau superficiel de matières grasses. Le manque de matériel ne nous a pas permis d'analyser ce lait. Il est vraisemblable que la coagulation de la caséine peut être influencée par de nombreux facteurs et il serait curieux de rechercher si la variabilité que nous avons observée dans la coagulation du lait ne serait pas, dans une certaine mesure, non seulement fonction du germe étudié mais encore du milieu de culture. C'est à ce titre que nous rapportons cette observation.

Au point de vue de la diagnose, *B. Bruntzi* ne coagule pas le lait mais il fait légèrement fermenter le lactose. Cette fer-

mentatiou n'est pas en contradiction avec la non coagulation observée. En effet *B. Bruntzii* peut faire fermenter le lactose et produire de l'acide lactique mais en quantité insuffisante pour amener la coagulation de la caséine, soit à 37°C, soit à température du laboratoire. Cependant la quantité d'acide lactique fournie pourrait être assez grande pour déterminer la coagulation à 50°C ou à 100°C.

Sur tubes de lait tournesolé, après culture de vingt jours, on constate que la teinte est passée du bleu au rouge violacé. La réaction est donc acide au tournesol. Les tubes chauffés à 100°C donnent une coagulation. Celle ci est obtenue en cinq minutes à 65 et 70°C. La coagulation de la caséine par l'acide lactique n'est donc, somme toute, qu'un indicateur de la réaction acide. On peut ainsi faire état d'une méthode de mise en évidence de la réaction acide par chauffage des cultures.

*Lait éthérifié* (Hollande, 1915). Les cultures de *B. Bruntzii* en lait éthérifié offrent des caractères analogues à ceux que l'on observe avec le lait entier.

## Indol et Phénol

*Indol.* — La recherche de l'indol a été effectuée sur des cultures âgées de quatre à quinze jours, soit directement sur les solutions de peptone soit sur l'extrait éthéré des cultures (technique de Gauthier) et dans ce dernier cas le réactif indicateur utilisé était la paradiméthylamidobenzaldehyde.

*B. Bruntzii* a été ensemencé sur des solutions peptonées à 3 0/0 et placées les unes à 35°C les autres à 15 C. Dans aucun cas il n'a été possible de mettre l'indol en évidence dans les cultures de *B. Bruntzii* bien que les milieux peptonés employés donnaient la réaction de l'indol en dix heures avec le Colibacille.

*Phénol.* — La recherche du phénol a été faite d'après les indications données par Dobrwotski. La culture est mise à distiller en présence d'acide chlorhydrique dans la proportion de 50 parties d'acide pour 250 de liquide à étudier. Les phénols sont entraînés par la vapeur d'eau.

Sur le distillat on effectue les trois réactions suivantes :

1° L'eau bromée donne avec le phénol un précipité ou un trouble (tribromophénol) ;

2° Les phénols en présence de soude se combinent avec l'iode donnant un précipité rose :

3° Le distillat, alcalinisé par NaOH est agité avec de l'éther ; on évapore ce dernier. Le résidu traité par une solution alcoolique de perchlorure de fer donne une teinte violacée s'il contient du phénol.

Ces 3 réactions ont été négatives avec les cultures de *B. Bruntzii*. Comme nous le voyons, l'absence d'indol s'accompagne de celle de phénol. Cette constatation cadre avec l'opinion de Dobrwotski (1910) et de Lasseur (1911) qui n'ont pu découvrir de phénol dans les cultures des Bactéries qui ne produisent pas d'indol.

### Hydrogène sulfuré

*B. Bruntzii* ensemencé sur gélose au plomb de l'Institut Pasteur donne par endroit un très léger noircissement avec des plaques gris noirâtre. Le dégagement d'Hydrogène sulfuré est donc très faible.

### Rouge neutre

Sur gélose au rouge neutre, *B. Bruntzii* ne produit aucun virage ni aucune fluorescence.

## Action sur les sucres

Parmi les propriétés biologiques, il en est une qui offre une grande importance dans l'étude d'un germe, c'est l'action sur les sucres. C'est en étudiant l'action fermentative de germes tels que le méningocoque, le gonocoque, les pseudoméningocoques que l'on a pu différencier ces germes ; il en est de même pour les Bacilles dysentériques et pour les germes du groupe typhique, paratyphique et coli.

L'action fermentative des germes doit être réalisée en observant les précautions suivantes :

1° Le sucre employé, doit répondre aux qualités de pureté, aux propriétés optiques, aux caractères de cristallisation exigés par les données physiques et chimiques ; en un mot il doit être pur.

2° Le milieu nutritif doit être exempt de sucre. Nous avons pris la précaution de préparer nos milieux sucrés, non pas à partir du bouillon de viande de bœuf qui contient du glucose, mais à partir d'une solution peptonée salée (peptone 20 grs., chlorure de sodium 5 grs., eau 1000 grs.), solidifiée par l'addition d'agar et neutralisée. Ce milieu nutritif a été additionné de 2 0/0 de sucre chimiquement pur et tournesolé à la teinture de tournesol concentrée de l'Institut Pasteur.

A la température du laboratoire *B. Bruntzii* accuse des propriétés fermentatives intenses, se complétant, vis-à-vis de certains sucres, de la propriété dite de caméléonage.

L'hydrate de carbone qui semble être le plus rapidement attaqué est le glucose, l'acidification envahit tout le tube en moins de trois jours, puis la teinte rouge du tournesol vire au bleu vers le cinquième jour et au dixième jour le caméléonage est complet. La saccharose et le maltose sont aussi atta-

qués mais plus lentement et ce n'est qu'à partir du douzième jour que le milieu est devenu entièrement rouge, le virage au bleu est total au bout de vingt-cinq jours.

Le lactose et le lévulose subissent eux aussi une fermentation évidente, mais sans phénomène de caméléonage.

Nous n'avons pas pu déterminer la quantité de sucres consommée par les Bactéries dans les cultures par suite des circonstances dans lesquelles le travail a été fait.

### Action sur les alcools polyatomiques

L'action fermentative de *B. Bruntzii* s'est montrée positive à l'égard de la glycérine, de la mannite et de la dulcite, sans phénomène de caméléonage.

### Action sur les nitrates

*B. Bruntzii* a ét éensemencé sur bouillon nitraté et sur eau peptonée nitratée.

Après cinq jours de culture, la recherche des nitrites a été effectuée avec le réactif de Griess. Dans l'un et l'autre de ces milieux nous avons constaté la coloration rouge attestant la positivité de la réaction. Les tubes témoins non ensemencés ont donné une réaction négative. Cette réaction traduit donc la réduction des nitrates en nitrites, mais sans dégagement *apparent* d'azote. Les laboratoires où ont eu lieu nos recherches ne possédant pas de mercure, il ne nous a pas été possible d'utiliser le dispositif de Grimbert et par suite nous ne pouvons affirmer le non dégagement d'azote.

Ces recherches nous ont permis en outre de constater l'éclaircissement rapide (après deux ou trois jours) des cul-

tures en milieux nitratés, fait que l'on n'observe pas en l'absence de nitrates puisque les cultures en bouillon ordinaire présentent un trouble persistant plusieurs semaines.

## Ferments

Certaines Bactéries sont capables de produire des dislocations plus ou moins profondes du substratum sur lequel elles se développent. Nous n'étudierons pas séparément : 1° les processus liés à la nutrition et au cours desquels l'énergie libérée est utilisée par le plastide ; 2° les processus de fermentation qui ne sont pas nécessairement liés à la nutrition du plastide et qui relèvent des ferments solubles agissant pour disloquer la substance. Dans ce cas, ce sont surtout de faibles modifications de substratum qui interviennent et qui se caractérisent par l'action hydrolysante des enzymes.

Nous nous bornerons ici à l'étude des modifications de cultures pouvant servir à la diagnose de l'espèce étudiée.

## Ferments protéolytiques

### *Action sur la gélatine*

Nous avons vu que *B. Bruntzii* ne liquéfie pas la gélatine à la température de 15° C., quelles que soient la concentration en gélatine (10, 15 0/0) et la teneur en peptone du milieu utilisé.

H. de Waele et A. J. Vandevelde admettent que « la propriété de peptiser la gélatine n'est pas qualitative mais quantitative ». En effet, lorsqu'on dose les albumoses et les peptones en suivant la méthode proposée par ces auteurs les microbes que l'on considère comme liquéfiants, peptonisent

rapidement la gélatine et ceux qui passent pour ne pas la liquéfier le font cependant mais plus lentement.

En effet à côté des Organismes liquéfiant rapidement la gélatine comme *B. pyocyaneus*, *B. fluorescens liquefaciens* on observe des Organismes la liquéfiant beaucoup moins rapidement et d'autres ne déterminant qu'un ramollissement du milieu.

Appliquant la technique de H. de Waele et de J. Vandevelde (1905) à l'étude de l'action de *B. Bruntzii* sur la gélatine, nous avons recherché si ce germe attaquait cette substance tout en ne poussant pas la dislocation du substratum jusqu'à la liquéfaction.

Un volume donné (40 cmc.) de bouillon gélatiné est ensemencé et porté à l'étuve à 35°C. pendant quinze jours Après ce séjour on verse le milieu de culture dans un vase à précipité ; on lave le ballon avec 10 centimètres cubes d'eau chaude puis avec 60 centimètres cubes d'alcool à 94 degrés. On réunit tous les liquides de lavage, on complète la précipitation par addition de 100 centimètres cubes d'alcool à 94 degrés. On obtient finalement un liquide d'un titre alcoolique voisin de 70, 71 degrés, tenant en solution les albumoses et les peptones et en précipitation la gélatine. On laisse déposer vingt-quatre heures, on jette sur un filtre, on lave le précipité à l'alcool à 70 degrés, on sèche à 100° C. Le précipité ainsi obtenu est constitué exclusivement par la gélatine, les peptones et les albumoses restant en solution dans l'alcool à 70 degrés. C'est du moins ce qu'affirment de Waele et Vandevelde.

On opère rigoureusement de la même façon sur un témoin non ensemencé.

Les résultats obtenus avec cette méthode sont les suivants :

| | | |
|---|---|---|
| Bouillon gélatiné à 4 0/0, 160 cent. cubes. | Témoin. . . . . | 6 gr. 390 Gélatine |
| | Culture de 15 jours à 35° C. | 6 gr. 122 — |

Le bouillon gélatiné ensemencé, mis à l'étuve durant quinze jours accuse une teneur en gélatine plus faible que le témoin.

Une réserve doit être faite : la méthode de Waele et de Vandevelde ne nous a pas permis d'obtenir des chiffres concordant au milligramme et si nous faisons figurer ces chiffres ici c'est sans leur attribuer une valeur bien précise.

La non-liquéfaction de la gélatine par *B. Bruntzii* laisse prévoir que celui-ci sera sans action sur le sérum coagulé, sur le blanc d'œuf, etc., bien que Malfitano (1905), soit arrivé à dissocier dans la protéase charbonneuse le pouvoir albuminolytique du pouvoir gélatinolytique.

### *Action sur le sérum coagulé*

*B. Bruntzii* ensemencé sur sérum de bœuf, coagulé à une température telle que le sérum soit coagulé sans être blanc opaque, et sur sérum coagulé de l'Institut Pasteur n'a produit aucune liquéfaction du milieu ni à 35° C. ni à la température du laboratoire.

### *Action sur le blanc d'œuf*

Un cube de blanc d'œuf coagulé de 1 centimètre de côté est déposé au fond d'un tube de bouillon que l'on ensemence avec *B. Bruntzii*. Après quinze jours de culture soit à 36° C., soit à la température du laboratoire les angles ne sont pas émoussés et le blanc d'œuf n'est pas devenu transparent.

### *Action sur la fibrine*

Un fragment de fibrine de sang de mouton est déposé au

fond d'un tube de bouillon ordinaire. Le tube est ensemencé avec *B. Bruntzii*, après quinze jours de culture soit à 35° C., soit à la température du laboratoire la fibrine n'est pas attaquée.

## CHAPITRE III

## CULTURES EN MILIEU SYNTHÉTIQUE

Avec les milieux usuels dont la composition chimique et la constitution physique sont variables, *B. Bruntzii* ne donne des cultures caractéristiques que sur plaques de gélatine, aussi, avons nous été conduits à rechercher d'autres caractères de diagnose du Bacille, notamment ceux fournis par les cultures en *milieu synthétique*.

M. Lasseur a mis gracieusement à notre disposition une certaine quantité de produits purs dont il se sert dans ses recherches ; nous avons pu ainsi cultiver *B. Bruntzii* sur milieu chimiquement défini.

Parmi les solutions nutritives préconisées par différents auteurs, c'est le milieu S. I. de Lasseur qui nous a donné les meilleurs résultats. Nous nous bornerons donc à relater ici ce que nous avons obtenu avec ce liquide nutritif.

### Caractères des cultures effectuées à la température du laboratoire

*Après vingt quatre heures.* — Collerette, légère pellicule, trouble surtout sensible dans le premier tiers supérieur du liquide ; très légère teinte rose visible par transparence sur fond blanc en comparaison avec un témoin.

*Après quarante-huit heures.* — Toute la masse est troublée. La collerette atteint de 1 à 2 millimètres de haut avec

une pellicule mince. De distance en distance, dans la pellicule, de petits épaississements, constitués par des amas de Bactéries, se détachent au moindre mouvement et tombent au fond du tube. La masse présente une légère teinte rosée.

*Après quatre jours.* — Collerette, pellicule ; les épaississements se détachent aussi facilement et lorsque le tube est un peu incliné, de nombreux flocons s'accolent sur les parois. Parfois la teinte rosée augmente d'intensité, surtout vers le fond du tube ou sur une zône sub-inférieure.

*Après huit jours.* — La collerette atteint 3 à 4 millimètres de hauteur. La pellicule est un peu épaissie, donnant un voile très fragile et très mince. Les îlots d'épaississement se sont multipliés. Le voile est très finement chagriné, surnageant une zône de liquide peu ou pas coloré, alors que la portion inférieure du tube est rouge vineux et la partie médiane rose fleur de pêcher.

*Après quinze à vingt jours.* — Le tube de culture est coloré entièrement en rouge vineux, le voile grimpant reste blanc, fixé à une collerette rouge.

*Après un à deux mois.* — La teinte rouge vineux foncé et le liquide s'éclaircit. On perçoit une odeur vineuse très nette, rappelant celle du vin ayant séjourné un peu à l'air « *vin éventé* ».

*Après trois mois.* — La coloration atteint le rouge violet foncé, la culture est légèrement fluorescente, l'évaporation du liquide atteint 1 centimètre, le voile devenu rouge tapisse les parois du tube de ses fragments. Ce voile, solidement fixé, n'a pu suivre la baisse de niveau du liquide et s'est tendu jusqu'à la rupture.

La coloration constatée persiste des mois sans modifications dans les tubes bouchés au coton, et conservés à une température relativement basse (10° C. à 12° C.) pour éviter

une évaporation trop grande. Si l'on a soin de garder les cultures en tubes scellés la coloration persiste sans modifications pendant plusieurs années. Cette substance colorée est donc très stable, ce qui n'est pas le fait de la généralité des pigments bactériens qui, pour la plupart, diminuent d'intensité très rapidement.

Tel est le schéma de l'ensemble des phénomènes que l'on observe dans les cultures de *B. Bruntzii* sur milieu S. I. Mais on peut constater certaines variations dans la date d'apparition du chromogène, dans l'intensité de coloration, etc..., faits sur lesquels nous reviendrons ultérieurement.

Nous n'avons pas l'intention d'étudier le rôle des différents constituants du milieu S. I. Nous nous bornerons à l'étude de l'action de l'aliment hydro-carboné, du sulfate de magnésie et du sulfate de fer.

## Aliments hydro-carbonés

En 1911, Lasseur a montré qu'on pouvait remplacer la glycérine par d'autres éléments hydro-carbonés, tels que glucose, lévulose, maltose. Aussi, avons-nous essayé de cultiver *B. Bruntzii* sur le milieu S. I. dans lequel la glycérine est remplacée par du glucose.

Au bout de *quarante-huit heures*, à la température du laboratoire, *B. Bruntzii* offre une culture avec collerette rose ou rouge et une pellicule légère : le trouble est limité surtout à la partie supérieure.

Après *dix jours*, le voile est très mince, très fragile, blanc, offrant quelques épaississements colorés en rouge. Ces derniers sont dûs à des amas maintenus plus solidement par le voile que dans les milieux à base de glycérine. Le trouble

est surtout intense dans la partie supérieure du tube, alors que le reste est sensiblement limpide. La teinte rouge violette s'étend sur une zône de 10 à 15 millimètres à la partie supérieure du liquide.

Des passages successifs sur ce milieu offrent un aspect identique à celui décrit ci-dessus.

*B. Bruntzii*, ensemencé sur milieu S. II., offre des cultures sensiblement les mêmes que sur milieu S. I. tout au plus peut-on surprendre une apparition plus hâtive de la coloration rouge.

*Milieu S. I. sans hydrate de carbone*

En l'absence d'hydrate de carbone, la végétation est beaucoup plus lente et plus faible. La collerette persiste, la pellicule montre de nombreux cristaux pouvant atteindre plusieurs millimètres constitués par du phosphate ammoniaco-magnésien. L'attaque de l'asparagine est plus profonde et plus active et la coloration rosée est moins marquée que dans le milieu S. I. normal.

Par passages successifs en milieux dépourvus d'aliments hydro-carbonés, la production des substances colorées diminue considérablement. Non seulement l'intensité de la coloration est plus faible, mais le nombre de tubes ensemencés restés incolores augmente. En somme, bien qu'il ne soit pas rigoureusement indispensable, l'aliment hydro-carboné favorise la production des matières colorantes.

*Milieu synthétique glycériné et milieu synthétique glycériné-glucosé*

L'apparition de la coloration présente une certaine différence qui paraît assez constante, si l'on considère les ense-

mencements sur milieu S. I.glycériné et sur milieu S. I. glucosé ou glycériné-glucosé.

Dans les milieux glycérinés, la coloration apparaît souvent simultanément dans toute la culture. Elle est d'ailleurs extrêmement faible, à peine rosée et son intensité augmente du fond du tube pour gagner la partie sub-terminale, mais très rarement la surface. On a pu constater parfois l'apparition d'emblée de la coloration dans le fond du tube. Au contraire, dans les milieux glucosés glycérinés, la coloration apparaît toujours à la zône de la surface et ce n'est que peu à peu qu'elle envahit toute la masse du liquide.

### Rôle du sulfate de magnésie

Kuntz (1900), Samkow (1903), Sullivan (1905) montrent l'influence du magnésium à l'état de sulfate dans la production des pigments rouges de *B. prodigiosus*, de *B. rosaceus metalloïdes*, de *B. ruber balticus*. Pour ces auteurs, la présence de ce sel est indispensable à la formation des pigments. Simon (1908) montre que pour *B. syncyanus*, la dose optima de sulfate de magnésie est comprise entre 40 et 50 centigrammes 0/0. Avec Lasseur (1911), nous voyons que le magnésium est nécessaire à la production de la chlororaphine et que le sulfate de magnésie donne des résultats constants. Nous avons recherché l'influence de ce sel sur la production de la coloration rouge intéressant le germe que nous étudions.

A cet effet, nous avons ensemencé une série de tubes de milieu S. I. ne contenant pas de sulfate de magnésie, avec une goutte de culture prélevée sur milieu type S. I. La culture obtenue est manifestement plus faible et la teinte est

rose fleur de pêcher le dixième jour. Nous repiquons une deuxième série de tubes de milieu sans sulfate de magnésie : au *quatrième jour* on constate un trouble sans coloration. En réalité, au deuxième passage, il y a eu encore production de matière colorante, mais la coloration est beaucoup plus faible et surtout plus longue à apparaître. Le sulfate de magnésie ne semble donc pas indispensable à la production du corps coloré, mais il la favorise.

### Action du sulfate de fer

En 1911, dans un travail sur *B. chlororaphis*, Lasseur démontre irréfutablement que le fer est indispensable à la production de la chlororaphine. C'est la première fois que le rôle du fer, dans la production des pigments, est prouvé. L'auteur cherche par quel mécanisme agit le fer : « jusqu'à présent, dit-il, à mon avis et dans le même ordre d'idées, on n'a étudié l'action du fer que dans les cultures de l'*Aspergillus niger*. Raulin (1870), dans son étude classique, admet que « par le fait même du développement de l'*Aspergillus* en l'absence de sels de fer, il a du se former une substance vénéneuse pour la Mucédinée, substance que les sels de fer empêchent de se produire, mais ne peuvent détruire. » Pour Linossier (1890-1891), l'apport du fer au milieu de Raulin favorise la sporulation en apportant un élément indispensable qui entre dans la composition des pigments des spores. Enfin Sauton (1910) explique le rôle du fer en montrant que, non seulement ce métal, mais aussi l'oxygène semblent nécessaires pour la sporulation... Il émet l'hypothèse que le fer agit comme porteur d'oxygène dans le liquide de Raulin. Ces tentatives d'explication sur le rôle du fer dans les cul-

tures de l'*Aspergillus* ne permettent pas de se rendre compte d'une façon satisfaisante de l'influence de ce métal sur la production de la chlororaphine... »

Lasseur fait ensuite l'étude critique des hypothèses de Raulin, Linossier et Sauton, il lui semble difficile de n'attribuer au fer que le rôle de porteur d'oxygène. Poursuivant ses recherches (1913), cet auteur en collaboration avec G. Thiry a obtenu des cultures roses, rouges violettes et rouges à partir de Bactéries des groupes *B. subtilis*, *mesentericus vulgatus*, *peptonis XII* de Flügge, *mesentericus ruber*, *mesentericus niger*, *Megatherium*, ensemencés sur milieu synthétique.

L'emploi de ce milieu lui a permis d'exalter la fonction chromogène de certaines Bactéries ou d'obtenir des cultures colorées avec des germes considérés comme achromogènes. La même année, il cherche à préciser l'action du fer dans la production de la substance chromogène. A cet effet, des cultures en milieu S. I. dépourvu de sulfate ferreux, cultures par conséquent incolores, sont additionnées de ce composé ferreux. On observe instantanément l'apparition de la coloration spécifique de la culture. Il en est de même si, au lieu d'employer du sulfate ferreux, on utilise le citrate ferreux, le chlorure ferrique, le sulfate de fer ammoniacal, l'alun de fer ammoniacal. Le sel de fer agit donc par sa « *base* ».

L'action du fer est spécifique... « En effet, le manganèse, le nickel, le cobalt, le zinc, le chrôme ne donnent pas de coloration. Cette coloration instantanée des cultures est vraisemblablement dûe à la combinaison d'une substance incolore avec le fer... » Estimant « que le rôle du fer dans les milieux de culture est beaucoup plus complexe que cette observation pourrait le faire croire », il se propose de montrer ultérieurement que le fer agit en outre à l'état de traces en favorisant

la production de *substances mères des corps colorés*, tandis que la coloration des cultures, phénomène secondaire, exige des quantités de fer beaucoup plus considérables.

En 1914, l'auteur, à l'aide d'une technique dont le principe lui avait été indiqué par le Professeur L. Grimbert, arrive à extraire des cultures les pigments de 12 espèces bactériennes. C'est ainsi qu'il a obtenu des cultures du groupe *subtilis* et *mesentericus* une substance incolore donnant en présence de sels de fer une coloration intense. C'est la *substance mère* dont il parle antérieurement. N'étant arrivé ni à la faire cristalliser, ni à en obtenir des combinaisons cristallisées, il en a momentanément délaissé l'étude.

Nous inspirant des travaux de Lasseur, nous nous sommes efforcés de préciser l'action du fer sur *B. Bruntzii*.

## Caractères des cultures sur milieu S. I. dépourvu de fer

Sur milieu synthétique dépourvu de fer, *B. Bruntzii* donne des cultures offrant dans leurs grandes lignes le même aspect de végétation que sur milieu complet. On note cependant un plus faible développement et on ne constate jamais de coloration rouge, les cultures jeunes sont rigoureusement incolores, les cultures âgées colorées en jaune.

L'addition de sulfate ferreux détermine *instantanément* l'apparition d'une teinte rouge violacée ; une goutte de solution à 1 0/0 de sulfate ferreux pour 10 centimètres cubes de culture est plus que suffisante, des quantités beaucoup plus faibles de fer déterminant la coloration. Avec les autres sels de ce métal on obtient aussi le rougissement, mais le sulfate ferreux donne des colorations plus intenses et plus rapides.

La coloration obtenue par addition de sulfate ferreux à des

cultures incolores est identique à celle qui se développe dans les cultures effectuées en présence de fer. On peut mettre en évidence, par d'autres procédés moins rigoureux, mais tout aussi suggestifs, ce phénomène de coloration en utilisant la *gélose minérale* préconisée par Lasseur et préparée ainsi : gélose rigoureusement purifiée, dissoute dans l'eau distillée à chaud dans la proportion de 2 0/0. On porte à 120° C. on filtre et on stérilise. A une partie de milieu S. I. on ajoute aseptiquement une partie de gélose fondue, on mélange, on incline pour refroidissement. Les tubes sont éprouvés par un séjour à étuve de vingt-quatre heures. Le milieu est rigoureusement incolore, les colorations seront donc très faciles à percevoir par la suite.

On fait un milieu identique mais avec un liquide S. I. *dépourvu de fer*. On ensemence chaque série de tubes avec *B. Bruntzii*. Au bout de dix jours, toute la masse de gélose contenant du fer a pris la teinte rouge violet intense, tandis que les cultures effectuées sur gélose privée de fer sont incolores, même après plusieurs mois.

Les cultures sur bouillon peptoné ne sont pas colorées, cependant sur les vieilles cultures on perçoit quelquefois par comparaison avec les tubes témoins (même milieu non ensemencé) une légère teinte rose. L'addition de fer fait apparaître dans ces cultures une coloration rouge violacée qui rappelle celle signalée par Gessard (1919) et Mamelle (1919) chez une nouvelle variété de Bacille pyocyanique isolé simultanément par Gessard et Lasseur. (C'est la troisième variété du Bacille pyocyanique, race érythrogène).

Le rapprochement des cultures des deux germes : *B. pyocyaneus érythrogènes* et *B. Bruntzii* n'est pas inopportun, car cette coloration rouge violacée des cultures peptonées par les germes microbiens est rare et son intensité est tou-

jours très faible. Cependant, il ne saurait y avoir confusion entre les deux pigments secrétés par *B. Bruntzii* et *B. pyocyaneus*, car le pigment du Bacille pyocyanique érythrogène ne présente pas d'absorption sélective, tandis que celui de *B. Bruntzii* montre dans la partie visible du spectre une ou deux bandes très nettes suivant le solvant utilisé.

### Variations observées dans les cultures de B. Bruntzii ensemencé sur le milieu S. I.

Le voile, la collerette et la coloration des cultures de *B. Bruntzii* peuvent, en milieu S. I., présenter certaines variations que nous allons étudier successivement :

1° *Voile.* — Nous avons vu que le voile est réduit à une mince pellicule offrant çà et là des épaississements. Très fragile, il tombe par fragments au fond du tube. Il est des cas cependant où il est beaucoup plus résistant et sans jamais atteindre une grande épaisseur ; il peut persister et offrir moins de fragilité à mesure que les cultures vieillissent. Dans ce cas il est presque toujours rose ou rouge ;

2° *Collerette.* — La collerette est souvent colorée, mais cette coloration peut parfois faire défaut ;

3° *Coloration des milieux.* — Lorsqu'on ensemence une série de 40 à 50 tubes de milieu S. I. avec la même quantité (1 goutte à la pipette Pasteur bien effilée) d'une même suspension microbienne, on observe des différences dans la date d'apparition de la coloration et dans son intensité. Mais ces différences sont bien plus grandes, lorsqu'au lieu d'ensemencer les tubes avec la même émulsion on le fait avec des semences provenant de cultures effectuées sur des milieux différents ou des cultures provenant du même milieu, mais d'âge différent.

## Influence de la semence

Pasteur (1876), Fitz (1882), Wasserzug (1887-88), utilisant des semences différentes d'une même espèce bactérienne, ont obtenu des cultures ne présentant pas des caractères identiques. N'étant pas assez profondes pour qu'on ne puisse retrouver le type primitif, ces différences sont cependant assez marquées pour pouvoir dans la nature constituer des variétés ou des races de la même espèce. C'est à Grimbert (1893) et à Duclaux (1898) que revient l'honneur d'avoir précisé l'influence de l'âge de la culture et l'origine de la semence « Education de la semence ». Lasseur (1911-13) a observé chez les Bactéries chromogènes des faits analogues à ceux constatés par les savants précédents chez les Bactéries pathogènes et les Bactéries des fermentations. Mamelle et Gessard (1919) ont confirmé les vues de Lasseur.

## Age de la culture

Si on ensemence une série de tubes de gélose en milieu S. I. avec des semences provenant de cultures de quelques jours (quatre à dix jours) (1), on obtient des cultures à coloration hâtive et intense, tandis que si on utilise des semences provenant de cultures âgées (2 mois), on constate que la coloration apparaît plus tardivement. Il importe cependant de noter qu'après des semaines les cultures à coloration lente ont donné une intensité de teinte égale à celle des cultures à coloration hâtive.

1. La multiplication bactérienne est assez lente pour *B. Bruntzii*. Les cultures de quelques jours correspondent à peu près à celles de vingt-quatre heures de Bacilles à multiplication rapide (Eberth, paratyphique, Colibacille).

### Origine de la semence

A âge égal, les semences provenant de culture sur milieu S. I., donnent une intensité de coloration plus forte que les semences prélevées sur culture en gélose ordinaire. En outre, nous avons vu que dans le milieu S. I. où la glycérine est remplacée par le glucose, la coloration est plus hâtive vers la partie supérieure du tube. Si on effectue des passages successifs à partir de ces cultures. on obtient une coloration plus hâtive du milieu mais nullement plus intense.

A côté de ces constatations d'ordre général, nous croyons devoir relater des variations observées dans la coloration, sans d'ailleurs pouvoir en expliquer la raison (hétérogénéité de l'émulsion homogène en apparence, ou éléments nuisibles cédés par le vase au milieu de culture?). Lorsqu'on ensemence en effet 50 ou 100 tubes de milieu S. I. il n'est pas rare d'observer 1 ou 2 tubes n'offrant pas de coloration ; nous écartons l'idée d'une contamination qui nous serait révélée par le microscope. Ce fait n'a rien de surprenant, il a été constaté par tous ceux qui ont étudié le pouvoir chromogène. Remarquons simplement qu'il ne saurait à lui seul infirmer la valeur du pouvoir chromogène, car il n'est pas un seul caractère des Bactéries, utilisé comme élément de diagnose, qui ne soit sujet à des variations et la virulence plus que tout autre.

### Variation dans la production de la substance mère

La substance incolore qui donne naissance à la coloration rouge violacée sous l'action des sels de fer, doit, *a priori*,

offrir dans sa production des variations analogues à celles que présente la substance rouge. En effet, lorsqu'on ensemence une série de 25 ou 50 tubes de milieu S. I. dépourvu de fer, on constate que l'addition ultérieure de fer détermine des intensités de coloration différente : 50 0/0 environ des tubes offrent une intensité moyenne que nous représenterons par *le coefficient 5 : 25 0/0* offrent une intensité maxima variant *des coefficients 5 à 10 et 25 0/0* une intensité minima variant des *coefficients 5 à 0.*

On observe des différences selon que la semence provient ou ne provient pas d'un milieu renfermant du fer, qu'elle a été, au préalable, émulsionnée dans l'eau physiologique, ou transportée directement du milieu de culture dans le liquide à ensemencer.

Si la semence est prélevée d'un milieu renfermant du fer, la quantité de germes introduits dans le nouveau milieu au fer n'est pas sans avoir une action notable : en effet, des traces de fer de l'ordre du 1/10 de milligramme pour 10 centimètres cubes de milieu favorisent très notablement la production de la substance mère, ce qui est mis en évidence de la façon suivante :

*Série A.* — Tubes de milieu S. I. dépourvu de fer.

*Série B.* — Tubes de milieu S. I. abandonné au préalable à l'obscurité jusqu'à éclaircissement, décanté et réparti aseptiquement en tubes stériles.

*Série C.* — Tubes de milieu S. I. additionné de 1 milligramme de fer au lieu de 10 milligrammes pour 100 centimètres cubes.

*Série D.* — Tubes de milieu S. I. normal servant de témoin.

*La série A* donne des cultures incolores ou légèrement jaunes. L'addition ultérieure de fer donne une coloration

rouge violet dont nous représenterons l'intensité moyenne par le *coefficient 5*.

*La série B* donne des cultures incolores ou jaune d'or. Cette coloration ne paraît pas dûe à l'action de la substance mère sur le fer resté dissout, car la teinte obtenue avec des traces de cette substance et celle constatée au début dans les cultures en milieu S. I. normal est tout à fait différente. L'addition de sulfate de fer à ces cultures jaune d'or donne une coloration d'intensité représentée par le *coefficient 10*, c'est-à-dire double de celui observé pour *la série A*.

*La série C* se comporte sensiblement comme *la série B*.

Quant à *la série D* elle donne des colorations normales.

*Action de la température dans la coloration des cultures*

La température ne paraît pas avoir une action bien importante sur la production de la coloration. En général, cette dernière se manifeste dans les limites possibles avec la végétation.

La production de la matière colorante n'est pas liée à la multiplication : aux températures limites de végétation, la multiplication est très faible et la coloration de la culture n'apparaît pas. Pour les températures maxima de :

36° C. on constate *végétation et coloration.*

36°5 C. on constate *végétation et coloration.*

37° C. on constate *végétation et coloration plus faible.*

38° C. on constate *végétation, pas de coloration.*

39° C. et 40° C., *pas de végétation, pas de coloration.*

Comme on le voit, c'est une zône achromatique bien étroite, si on la compare à celle observée avec la majorité des chromogènes.

### Variations par passages sur les animaux

Un organisme animal pouvant parfois jouer le rôle de « *filtre* » au sens de De Vries (1903), Morgan (1903), Cueno (1909-1911), il était intéressant de rechercher si le passage sur les animaux permettait d'obtenir des variations expérimentales du pouvoir chromogène de *B. Bruntzii*.

Les expériences effectuées sur la Tanche (*Tinca-tinca L*) ne nous ont pas permis de constater de variations du pouvoir chromogène de *B. Bruntzii*.

Etant donnée l'innocuité à peu près absolue de *B. Bruntzii* pour les animaux à température constante, il ne nous a pas été possible de multiplier nos recherches autant que nous l'aurions désiré.

## CHAPITRE IV

## ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DU PIGMENT

---

### Extraction de la substance colorée des milieux de culture (milieux synthétiques)

Pour l'extraction de la substance colorée des milieux de culture, nous avons suivi la méthode appliquée par Lasseur (1904).

Les cultures sur milieu S. I. sont filtrées rapidement sur papier et concentrées au quart de leur volume initial par distillation à basses pressions et à 40°-45° C. Le produit de concentration, maintenu à 40° C. est saturé par le sulfate d'ammoniaque et traité par l'alcool.

La liqueur alcoolique est traitée par l'acétone qui précipite une partie des sels. On évapore dans le vide à 37° C.-40° C,, on reprend par l'alcool à 80 degrés, on précipite par l'acétone. L'opération est répétée trois fois, et permet d'obtenir une masse onctueuse qu'il n'a pas été possible de faire cristalliser.

*Solubilité.* — Cette substance est assez peu soluble dans l'alcool à 95 degrés, dans l'acétone ; mais soluble dans l'alcool à 80 degrés et dans l'eau.

Elle est peu soluble dans la potasse diluée, pratiquement insoluble dans l'éther, le xylol, le chloroforme, faiblement soluble dans l'acide acétique.

Elle n'est précipitée ni par le tannin, ni par l'acétate d'alumine, ni par le chlorure de platine.

*Action des alcalis.* — La potasse à froid : pas d'action.

La potasse à chaud : décoloration immédiate.

L'ammoniaque à froid : pas d'action.

L'ammoniaque à chaud : diminution de l'intensité de coloration mais non pas de décoloration complète.

*Action des acides.* — L'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique n'ont pas d'action à froid. A chaud la décoloration est instantanée.

*Action des oxydants.*— L'eau oxygénée se comporte comme les acides précités.

## Etude du spectre d'absorption

L'étude a été effectuée sur des solutions aqueuses de pigment purifié, à l'aide du spectromètre d'Hilger et de la cuve de Baly. La source lumineuse utilisée était celle du Bec Auer. La précision des mesures atteint la première décimale à 25 0/0 près.

L'examen spectrométrique ayant été effectué sur des solutions colorées de concentrations variables, nous indiquerons successivement l'aspect du spectre pour les différentes concentrations.

I. — Pour une concentration C il y a :

Transmission de $\lambda = 696{,}5$ à $\lambda = 603{,}5$ et absorption continue à partir de $\lambda = 603{,}5$.

II. — Pour une concentration $\frac{C}{8}$ on observe une bande d'absorption très nette et symétrique.

Pour les concentrations telles que :

$C_1$ on note une absorption de $\lambda = 590{,}5$ à $\lambda = 545{,}2$.

$C_2$ on note une absorption de $\lambda = 587{,}2$ à $\lambda = 542{,}4$.

$C_3$ on note une absorption de $\lambda = 584{,}8$ à $\lambda = 539{,}5$.

Le maximum d'absorption correspond à $\lambda = 565{,}5$.

En résumé, pour une concentration C, l'aspect du spectre est le suivant :

| Transmission | Absorption | Transmission |
|---|---|---|
| de $\lambda = 695{,}5$ à $\lambda$ 590,5 | de $\lambda = 590{,}5$ à $= 545{,}2$ | de $\lambda = 545{,}2$ à $\lambda = 420$ |
| | D → E | |

## CHAPITRE V

### ACTION PATHOGÈNE

Nous avons expérimenté *B. Bruntzii* sur un certain nombre d'animaux. Toutes nos expériences ont été effectuées comparativement avec des animaux témoins. Les poissons non inoculés, vivant dans les mêmes conditions de milieu et de température, offrent les caractères d'animaux sains. L'aquarium en ciment de 2 m. × 1 m. × 0 m. 80, était placé dans un sous-sol et était alimenté constamment par un courant d'eau d'intensité moyenne. La mort des animaux en expérience ne saurait donc être attribuée à une cause accidentelle comme cela se produit si souvent avec les Poissons, mais bien à l'action du Bacille injecté.

*Inoculé par voie intra-péritonéale* aux animaux à *température constante* (8 centimètres cubes d'émulsion microbienne à un Cobaye de 250 grammes), ce germe s'est montré inoffensif au sens de Nicolle (1918) ; il en est de même pour le Lapin et la Souris.

Injecté au contraire à certains animaux *à température variable*, il se montre pathogène, et il se rapproche par plusieurs de ses caractères de différents organismes pathogènes pour les poissons notamment du Bacille de Babès et Riegler.

*B. Bruntzii* a été expérimenté sur le Barbeau commun (*Barbus fluviatilis*, Ag.) la Perche (*Perca fluviatilis*, L.) et la Tanche (*Tinca, tinca*, L.) ; mais nous ne relaterons ici que

les essais effectués sur la Tanche, animal beaucoup plus résistant et dont la mort accidentelle est moins fréquente.

*Inoculation aux Poissons* : Tanche (*Tinca, tinca*, L.). Les inoculations ont été faites soit dans la cavité du corps, soit dans la masse musculaire dorsale et ont donné lieu aux constatations suivantes :

*Injection dans la cavité du corps.*

*Premier essai.* — Une Tanche de 500 grammes reçoit 10 centimètres cubes d'émulsion microbienne. La mort survient en quarante-huit heures. Le Bacille se retrouve à la culture dans le sang du cœur. Les lésions ne sont pas nettes. On note des épanchements sanguins à la surface du corps, au niveau des opercules et une congestion des viscères en général.

*Deuxième essai.* — Dix Tanches de 150 à 250 grammes reçoivent chacune 1 à 2 centimètres cubes d'une émulsion d'une culture sur gélose âgée de quarante-huit heures, effectuée à la température du laboratoire.

Les Poissons inoculés présentent au bout de trois ou quatre jours des ecchymoses, certains se couvrent de mousse grisâtre (filaments mycéliens de Saprolégniacées ?). Les animaux sont affaiblis ; ils réagissent peu ou pas au toucher, ils montent à la surface pour aspirer de l'air ; puis les mouvements respiratoires s'accélèrent et en moins de deux heures, la mort survient, après que l'animal a respiré à la surface. Contrairement à ce que l'on observe avec le Bacille de Babès et Riegler, les Poissons ne présentent pas de pâleur et leurs branchies sont roses, rouges ou hémorragiques. On note aussi un léger épanchement sanguin sur les opercules et au niveau des nageoires. Le foie et le rein sont hyperémiés.

Avec des doses de 4 centimètres cubes pour des Tanches

de 150 à 180 grammes la mort survient en 24-48 heures. Les hémorragies sont les seuls signes constants.

Le Bacille n'a été isolé que trois fois sur six du sang du cœur chez les animaux ayant succombé aux faibles doses (1 cmc.) et quatre fois sur quatre pour ceux injectés à 2 centimètres cubes.

*Troisième essai.* — Onze Tanches d'un poids variant entre 200 et 370 grammes reçoivent chacune des doses d'émulsion de culture sur gélose de vingt-quatre heures de 0 cmc. 5 à 1 centimètre cube. La mort est survenue les quatrième, cinquième, sixième, huitième, neuvième et treizième jour.

Lorsque l'animal succombe du quatrième au sixième jour, on n'observe rien de caractéristique, sauf les phénomènes congestifs. S'il succombe les huitième, neuvième ou treizième jour, tantôt le corps offre une teinte jaune parsemée de points rosés très nombreux, tantôt il présente de nombreux petits foyers hémorragiques et la base de la nageoire caudale montre une zone particulièrement hyperémiée.

L'hémorragie est donc un signe constamment observé chez les animaux à infection lente ; elle manque chez ceux qui succombent rapidement. (Le Bacille se rencontre dans le sang du cœur 5 fois sur 11).

*Injection dans la masse musculaire dorsale.* — La mort n'est provoquée que par de fortes doses.

*Inoculation par ingestion.* — Les résultats ont été négatifs.

En résumé, *B. Brantzii* s'est montré pathogène pour la Tanche. Sa virulence est faible, si on la compare à celle du *B. piscicidus* qui tue le Carrssin (*Carassius vulgaris*, Nils) à la dose de 0 cm. 125 à 0 cm. 250, mais elle est de l'ordre de grandeur de celle de certains Organismes considérés comme pathogènes pour les Poissons tels que le Bacille de Charrin, le *B. piscicidus agilis*, etc...

Inoculation aux Batraciens : Grenouille (*Rana temporaria L.*). Six grenouilles reçoivent 0 cmc. 5 d'émulsion de culture de trente-six heures, par injection intracavitaire ; et six autres reçoivent 1 centimètre cube de la même émulsion dans le sac lymphatique dorsal. Dans ces conditions d'expérience, *B. Bruntzii* n'a montré aucune action pathogène pour la Grenouille, tandis que *B. ranicida* de Ernst et *B. hydrophilus fuscus* de Sanarelli sont, au contraire, très pathogènes pour la Grenouille verte.

## SÉROLOGIE

Il n'est pas nécessaire qu'un germe G. soit hautement pathogène à l'égard d'un organisme donné O. pour que l'inoculation répétée de G. détermine en O. l'apparition d'agglutinines et de sensibilisatrices spécifiques. La virulence d'une culture n'est pas toujours en rapport avec la production d'agglutinines. Telle culture non virulente peut être plus agglutinogène que telle autre souche virulente et inversement. Cependant, Vincent (1898) obtient plus facilement des sérums agglutinant avec des cultures virulentes qu'avec des souches de même espèce ayant perdu leur virulence. Ce fait est à rapprocher de celui cité par M. Nicolle qui signale la difficulté où l'on est d'obtenir l'immunité avec des germes morts et l'obtention fréquente de l'état anaphylactique plutôt que de l'état d' « *insensibilité* ». On observe des faits du même ordre lorsqu'on opère avec des germes de virulence variable, tels que *B. chlororaphis*, *B. balticus*, *B. pyocyaneus*, *B. Le Monnieri*, etc... Autant la « *préparation* » des Lapins est facile avec *B. chlororaphis*, *B. pyocyaneus*, *B. balticus*,

autant elle devient délicate avec *B. Le Monnieri*, *B. mesentericus*, etc... Pour cette seconde catégorie de germes en apparence avirulents ou atoxiques pour le Lapin, l'apparition du phénomène anaphylactique est fréquent, ce qui d'ailleurs n'empêche pas le Lapin de réagir dans le sens de l'immunité par la production d'anticorps homologues (Lasseur). En résumé, on peut considérer comme admis qu'il n'est nullement nécessaire qu'un antigène jouisse de propriétés toxiques à l'égard d'un Organisme pour y faire naître des anticorps. Aussi, avons-nous songé à effectuer les recherches sérologiques habituelles avec *B. Bruntzii*.

*Agglutination.* — M. Ph. Lasseur, qui étudie d'une façon systématique les réactions sérologiques avec un grand nombre de Bactéries, a bien voulu mettre à ma disposition du sérum de Lapin « *préparé* » avec *B. Bruntzii*.

Les suspensions bactériennes ont été préparées suivant la technique de Lasseur. Le germe est cultivé sur gélose en boîte de Roux. Après vingt-quatre à trente-six heures de culture à la température du laboratoire (20 à 25° C) les cultures des quatre boîtes sont mises en suspension dans 40 centimètres cubes d'eau physiologique (9 grammes de chlorure de sodium pour 1.000 centimètres cubes d'eau). La première boîte reçoit 40 centimètres cubes d'eau et par des mouvements d'oscillations on réalise la suspension microbienne ; on décante à la pipette à boule ; l'eau chargée de corps microbiens est versée dans la deuxième boîte de culture et on opère comme précédemment ; les quatre boîtes sont ainsi épuisées avec un volume total de 40 centimètres cubes d'eau ; la suspension microbienne obtenue est donc très dense. On la centrifuge, on décante et on remet la masse microbienne en suspension dans l'eau physiologique, on répète trois fois cette opération pour enlever les traces de milieu nutritif, enfin la dernière

émulsion est centrifugée très légèrement pour éliminer les quelques grumeaux bactériens inévitables et elle constitue ainsi une suspension homogène (au sens bactériologique du terme) qu'il suffira ensuite de diluer pour obtenir une concentration microbienne déterminée.

Le pouvoir agglutinant du sérum a été déterminé macroscopiquement et vérifié microscopiquement. Les lectures ont été faites après quatre heures de séjour à l'étuve à 37° C et nous ont permis de constater que le « sérum agglutinait au taux de 1/1200 en deux heures à 37°5 ».

Ce même sérum n'agglutinait pas au 1/50 les :

*B. prodigiosus.*
*B. balticus.*
*B. rosaceus metalloïdes.*
*B. mesentericus fuscus.*
*B. chlororaphis.*
*B. procyaneus erythrogenes.*

*B. Bruntzii* est donc agglutinable et agglutinogène. D'après Lasseur, *B. Bruntzii* en tant qu'antigène se comporte à peu près comme *B. Le Monnieri* : c'est un antigène d'activité et d'affinités moyennes.

« *Fixation de l'Alexine de Bordet-Gengou.* »
« *Déviation du complément des auteurs.* »

En ce qui concerne la fixation de l'alexine, je résumerai les conclusions inédites de M. Ph. Lasseur qui a recherché par sa méthode si le sérum de Lapin « *préparé avec B. Bruntzii renfermait des sensibilisatrices spécifiques* » :

« Le sérum dilué au 1/800 fixe encore une unité d'alexine exprimée en unité hémolytique. »

« Le sérum ne renferme pas de co-sensibilisatrices pour les

espèces bactériennes mentionnées dans l'étude de l'agglutination. »

« *B. Bruntzii* est un antigène à pouvoir absorbant assez faible de l'ordre de celui du *B. pyocyaneus*. »

## CHAPITRE VI

## CARACTERES DIFFÉRENTIELS DES BACTÉRIES AYANT DES PROPRIÉTÉS COMMUNES AVEC B. BRUNTZII

Afin de justifier la création d'une espèce nouvelle en faveur du germe isolé dans le présent chapitre les caractères différentiels des Bactéries ayant des propriétés communes avec *B. Bruntzii*.

Dans cette énumération nous ne mentionnerons pas les formes qui s'éloignent par trop manifestement du germe que nous avons étudié. Tels sont ;

1° Les formes rondes ;

2° Les formes spiralées ;

3° Les anaérobies stricts ;

4° Les thermophiles.

Ainsi réduite, l'énumération sera encore fort longue ; et cela tient au nombre restreint de caractères décrits par les auteurs ayant étudié les Bactéries que nous allons passer successivement en revue.

*Bacillus ochraceus* (Zimmermann).

1 μ 2 à 14 μ 5 × 0 μ 6 à 0 μ 7,
Liquéfie la gélatine.
Coloration jaune d'ocre du milieu.

*Bacillus rubefaciens* (Zimmermann).

0 μ 75 à 1 μ 6 × 0 μ 32.

Très mobile.
Les cultures sur gélatine sont rougeâtres ; la coloration devient rouge vineuse dans les vieilles cultures.
Culture sur pomme de terre : substratum rose.

*Bacterium nubilum* (P. et C. Frankland).

Gram : positif.
Liquéfie la gélatine.
Colonies rappellent l'aspect de colonies du B. subtilis.
Culture sur gélose : rose pâle.

*Bacillus prodigiosus* (Ehrenberg).

Mobile. fouets péritriches.
Liquéfie la gélatine.
Anaérobie facultatif.
Coloration des milieux usuels : rouge parfois avec reflets.
Production de méthylamine et de triméthylamine.

*Bacillus Kiliensis* (Breunig).

Mobile, fouets.
Liquéfie la gélatine.
Les milieux usuels sont colorés en rouge.

*Bacillus indicus* (Koch).

Bacilles courts, extrémités arrondies.
Mobile.
Liquéfie la gélatine.
Gélatine colorée en rouge
Gélose colorée en rouge brique.

*Bacillus Plymouthensis* (Fischer).

Se différencie du *B. prodigiosus* par la lenteur de liquéfaction de de la gélatine.
Les colonies sont filantes.

*Bacterium rosaceum métalloïdes* (Dowdswell).

Milieux de culture colorés en rouge, à aspect métallique.
La matière colorante donne au spectroscope 2 bandes d'absorption comprises.

entre $\lambda = 547$ et $\lambda = 522$.
$\lambda = 545$ et $\lambda = 526$.

*Bacille rouge de* Beauregard.

Diplobacille à forme conique.
Cultive difficilement sur gélatine.
La coloration des milieux est rouge vermillon.

*Bacille rouge de* Fortineau.

2 μ 5 × 0 μ 3.
Mobile.
Liquéfie la gélatine.
La gélatine est colorée en rouge.
Pomme de terre : coloration corail.
Sérum coagulé : liquéfaction et coloration corail.
Pathogène pour la Cobaye et le Lapin.

*Bacillus fuschsinus* (Boekhout et de Vries).

*Bacterium fuchsinum* (Wolff).

0 μ 6 à 0 μ 8 × 1 μ 5.
Extrémités arrondies. Pas mobile.
Liquéfie la gélatine.
Gélatine : coloration rouge intense.
Gélose : coloration rouge.
Lait : coagulation avec coloration rose.
Odeur des cultures : odeur de Poisson.
Obs. : L'absence de fouets ne permet pas de l'identifier avec le *B. prodigiosus*.

*Bacillus ruber* (Zimmermann).

0 μ 65 × 1 μ à 2 μ 5.
Mobile.
Sporulé.
Liquéfie lentement la gélatine.
Gélatine. } Coloration rouge carmin.
Gélose. }
Pomme de terre. }

*Bacillus coccineus* (Pansini).

Gram : positif.
Mobile.
Sporulé.

Liquéfie la gélatine et la colore en jaune.
Culture sur gélose rougeâtre.

*Erythrobacterium* (Santori).

Organisme court, à granulations rouge fuchsine.
Liquéfie la gélatine et la colore en rouge.
Bouillon.
Pomme de terre. } Coloration rouge.
Lait : coagulation.

*Bacillus sanguineus* (Schroel).

Mobile, coloration rouge des milieux usuels.

*Bacterium cerasinum* (Freund).

0 μ 9 à 1 μ 4 × 0 μ 7 à 0 μ 9.
Gram positif.
Gélatine.
Agar. } Coloration rouge cerise.
Bouillon.

Microbe rouge du Papillon du Ver à soie en Cochinchine de C. Broquet.

Ce germe est une variété de *B. prodigiosus* (Lasseur).

Coccobacille.
0 μ 5 à 0 μ 6.
Bouillon : coloration rose.
Gélose : coloration rouge carmin.
Gélatine : liquéfaction et odeur de triméthylamine.

*Bacillus ruber sardinæ* (Dubois Saint-Sévrin).

Mobile.
Liquéfie la gélatine.
Optimum de culture et de coloration, 37°C.

*Bacillus mesentericus roseus* (Zimmermann).

Gram positif.
Liquéfie lentement la gélatine.

*Bacillus lactis erythrogènes* (Hueppe).

1 μ à 1 μ 4 × 0 μ 3 à 0 μ 5.
Gram positif.
Liquéfie la gélatine.
Coloration rouge des cultures âgées.
Lait : coagulation lente.
Sérum coagulé : culture rouge.

*Bacillus erythrosporus* (Eidam).

Mobile.
Spore colorée en rouge.
Gélatine : coloration vert jaune.
Fluorescence des cultures.

*Bacillus mycoïdes roseum* (Grotenfelt).

Gélatine : colonies présentant l'aspect caractéristique des colonies du *B. mycoïdes*.
A l'abri de la lumière : colonies rouges.

Bacille rouge de Thévenin.

1 μ de long.
Mobile.
Cultures sur milieux actuels : coloration rouge.
Température optima de végétation et d'apparition du chromogène : 37°-38° C.
Se développe à 42° C.
Gélatine : liquéfaction et coloration rouge.
Gélose : coloration rouge.
Pathogène pour le Cobaye, le Lapin, le Rat, la Souris.

*Bacillus herbicola rubrum* (Burri).

Pomme de terre : coloration rouge.

*Pseudomonas* (Conradi).

Mobile, un fouet.
Culture donne de l'indol.
Colonies : rouges.

*Bacterium h* (Breunig).

1 μ 7 × 0 μ 8.
Cultures : coloration rouge pourpre.
Liquéfie la gélatine.

*Bacillus proteus ruber* (Fortineau et Soubrane)

Polymorphe. 2 à 4 μ. Filament.
Gram positif.
Liquéfie lentement la gélatine.
Gélose : culture rouge.

*Bacillus ruber aquatilis* (Lustig).

1 μ 8 à 3 μ de long. Extrémités arrondies.
Mobile. Formes filamenteuses.
Liquéfie la gélatine. Coloration rouge.
Gélose : coloration rouge des colonies.

Bacille rouge de Cozzolino.

1 μ × 4 μ. Extrémités arrondies.
Gram positif.
Liquéfie la gélatine. Coloration rouge.
Coagule le lait.
Pathogène pour la Souris.

Coccobacille rouge de la Sardine de Auche.

0 μ 8 à 1 μ.
Mobile.
Colore les milieux de culture en rouge.
Liquéfie la gélatine. Odeur de triméthylamine.
Optimum de coloration 38-40° C.

Bacille rouge de Le Dantec.

4 à 12 μ.
Mobile.
Sporulé.
Liquéfie la gélatine.

*Bacillus rubidus* (Eisenberg).

Très mobile.
Liquéfie la gélatine : coloration rouge brun.
Gélose : coloration rouge brun.
Sérum coagulé : liquéfaction.
Pomme de terre : culture rouge brun.

*Bacillus sulfureum* (Holschewnikoff).

Bâtonnet 0 μ 5 × 1 μ 5 à 2 μ 4.
Mobilité faible.
Liquéfie la gélatine.
Colonie de coloration variant du rouge brun au rouge.
Gélose : rose et brun rougeâtre.

*Bacillus fulvus* (Zimmermann).

0 μ 86 à 1 μ 3 × 0 μ 77.
Liquéfie la gélatine. Coloration rouge orangé.
Gélose : colonie jaune d'ocre.
Pomme de terre : culture jaune d'ocre.

*Bacterium lactericium* (Adametz).

Gram positif.
Gélatine. } Culture rouge cinabre
Gélose. }
Pomme de terre : pousse mal.

*Bacillus rubiginosus* (Catiano).

Mobile.
Culture rouge sur milieux ordinaires.

*Bacillus coccineus* (Catiano) *voir Bacillus coccineus* Pansini).

Mobile.
Gram positif.
Lait : coagulation.
Agar glycériné : culture rouge carmin.

*Bacillus rubescens* (Jordan).

0 μ 9 × 4 μ, extrémités arrondies.
Mobiles.
Gélose.
Pommes de terre. } Culture rouge chair.

*Bacillus carnosus* (Zimmermann).

0 μ 5 × 2 μ
Mobile.
Sporulé.
Liquéfie la gélatine
Gélatine.
Gélose. } Culture rose chair
Pomme de terre.

*Bacillus corallinus* (Slater).

1 μ × 2 à 3 μ, extrémités arrondies.
Mobile.
Gélatine.
Gélose. } Coloration corail.
Pomme de terre.

*Bacillus pyocinnabareus* (Ferchmin).

Vieilles cultures renferment des filaments.
Extrémités arrondies.
Gélatine.
Sérum coagulé. } Liquéfaction et coloration rouge.
Pomme de terre : culture jaunâtre puis rouge foncé.
Lait : coagulation et coloration rouge.
Cultures : odeur de triméthylamine.
Pathogène pour Souris, Lapin, Chien.

*Bacillus mesentericus ruber* (Globig).

0 μ 0 × 2 μ.
Mobile.
Sporulé.
Liquéfie la gélatine.
Pomme de terre.
Gélose. } Coloration blanc rosé.

*Bacillus Danteci* (Kruse).

Mobile.
Sporulé.
Liquéfie la gélatine.

*Bacillus apicum* (Canestrini).

Mobile.
Sporulé.
Gram positif.
Liquéfie la gélatine.
Coloration rouge des milieux.

*Bacillus ruber berolinensis* (Frankel).

Mobile.
Liquéfie la gélatine.
Coloration rouge.

*Bacillus pneumonicus agilis* (Schon).

Mobile.
Liquéfie la gélatine.
Fermente le glucose.
Me produit pas d'hydrogène sulfuré.
Coloration rouge des milieux.

*Bacillus vignalis* (Vignal).

Mobile.
Liquéfie la gélatine.
Coloration rouge des milieux.

*Bacillus liquefaciens communis* Sternberg).

Mobile.
Liquéfie la gélatine.
Coloration rouge.

*Bacillus pseudo-mycoïdes roseus* (Migula).

Sporulé.
Gram positif.
Liquéfie la gélatine. Coloration rouge.

*Bacillus rubiginosus* (Kern).

Liquéfie la gélatine.
Coloration rouge.

*Bacillus tuberosus* (Kern).

Liquéfie la gélatine.

*Bacillus velatus* (Gonnermann).

Liquéfie la gélatine.
Coloration jaune et rouge.

*Bacillus minniaceus* (Zimmermann).

Liquéfie la gélatine.
Coloration rouge.

*Bacillus rubellus* (Okada).

Mobile.
Sporulé.
Gram positif.
Liquéfie la gélatine. Coloration rouge.

*Bacillus rosaceus margarinicus* (Jolles et Winkler).

Mobile. Sporulé.
Gram positif.
Coloration rouge.

*Bacillus nitrogenes* (*B. denitrificans II*) (Burri et Schutzer).

Mobile.

*Bacillus rubescens* (*B. oogenes hydrosulfureus*) (Zœrkendœrfer), D. Migula.

Mobile.
Gram : positif.
Production de $H^2S$.
Coloration rouge des milieux usuels.

*Bacillus denitrificans* (I) (Burri et Schutzer).

Mobile.
Produit de l'indol.

*Bacillus anguillarum* (Canestrini).

(Pathogène pour l'Anguille : Peste rouge de l'Anguille).
2 μ 4 à 1 μ 5 × 1 μ à 0 μ 9.
Très mobile.
Gram, positif.
Liquéfie la gélatine.
Culture rosée.

Bacille de Babès et Riegler ou *Bacillus piscicidus versicolor* (Babès et Riegler).

Filaments ondulés.
Cils.
Liquéfie la gélatine.
Pellicule rosée.
Coagule le lait. L'anneau de crème devient après plusieurs semaines rouge clair.
Pomme de terre : série de teintes analogues à celles observées avec *B. Bruntzii*.
Anaérobie facultatif.
Pathogène pour la Carpe (*Cyprinus carpio*, L.) le Carassin (*Carassius vulgaris* L.) La Tanche (Tinca Tinca Nils L).
Les Poissons infectés présentent une pâleur sur tout le corps et aux branchies.

Bacille de la xanthose du Gardon de Wyss (probablement voisin du *B. proteus*.

Polymorphe.
Gram positif.
Mobile.
Cils.
Les colonies et gélatine ressemblent à celle du *B. proteus*.
Pomme de terre : culture rose.

Ces trois derniers Bacilles, et principalement le Bacille de Babès et Rigler, sont ceux qui se rapprochent le plus de

*Bacillus Bruntzii.*

*Bacillus subrubiginosus* (Maschek).

Mobile.
Brun rouge.

*Bacillus rubrum* (Migula).

Mobile, rouge.

*Bacillus roseus Fischeri* (Migula).

Mobile, rouge.

*Bacillus rubefaciens pyogenes* (Matzuschita).

Mobile.
Ne fermente pas la glucose.

*Bacillus Kermesinus* (Tataroff).

Sporulé.

*Bacillus subrubeus* (Kern).

Sporulé.

*Bacillus subcarnosus* (Kern).

Liquéfie la gélatine.

*Bacillus roseus* (Losski).

Très courts bâtonnets.
Colonie rondes grisâtre sur gélatine.

## CONCLUSIONS

*B. Bruntzii* est une espèce nouvelle dont la taille moyenne est de 1.5 $\mu$ $\times$ 0.5 $\mu$. se présentant le plus souvent sous l'aspect d'un Diplobacille immobile à cytoplasme vacuolaire et à condensation polaire. Il n'est pas sporulé. Il se colore facilement par les couleurs d'aniline et ne prend pas le GRAM.

Comme tous les germes que l'on isole des eaux, sa température optima est voisine de 25°C. Au-dessus de 37° C il ne cultive plus. Il présente une résistance notable à l'acide phénique Sur gélatine, ses colonies ressemblent à celles des Bacilles typhiques et paratyphiques et du Colibacille. Sa vitalité est d'assez longue durée, il est aérobie. Une température de 60° le tue en une minute et il réagit par un chimiotactisme négatif vis-à-vis du phénol.

Il ne produit pas de ferments protéolytiques à la température du laboratoire. Il ne coagule par le lait à la température ordinaire ni à 36°. Il attaque les sucres et produit le phénomène du caméléonage sur certains milieux sucrés tournesolés. Il réduit les nitrates en nitrites. Il ne produit m'indol ni phénol.

Sur milieu synthétique de LAESSEUR il donne naissance à un pigment rouge vineux. L'action du fer dans ce milieu nutritif est nettement spécifique : ce métal agit à l'état de traces pour favoriser la production de substances mères des corps

colorés et à faibles doses pour faire apparaître la coloration rouge vineux.

La substance colorée est surtout soluble dans l'eau et dans l'alcool à 80 degrés. Les acides, les bases provoquent à chaud sa décoloration. La solution aqueuse de pigment purifié présente une absorption entre $\lambda_o = 590{,}5$ à $\lambda = 545{,}2$.

*B. Bruntzii* est un antigène d'activité et d'affinité moyennes. Son pouvoir absorbant est faible, il est de l'ordre de celui du Bacille pyocyanique. Il est pathogène pour la Tanche.

# INDEX BIBLIOGRAPHIQUE


1870. *Raulin (J.)* — Etudes chimiques sur la végétation (Thèse de doctorat sciences physiques. Paris, Masson, 1905, p. 183 et 188).

1876. *Fitz (A.)*. — Uber die Gährung des Glycerins (Ber. d. deutsch. Chem. Gesellschaft, t. IX, p. 1348).

1876 — Uber alkoholische Gährung (Ber. d. deutsch. Chem. Gesellschaft, t. IX, p 1332).

1876 *Pasteur*. — Etudes sur la bière (Gauthier-Villars, Paris, p. 287).

1877. *Fitz (A.)*. — Uber Schizomyceten Gährungen Glycerin, Mannit, Stacke, Dextrin (Ber. d. deutsch. Chem. Gesellschaft, t. X, p 276).

1882. *Guignard et Charrin*. — Sur les variations morphologiques des microbes (C R Acad. Sciences, p. 1192).

1807. *Wasserzug*. — Sur la formation de la matière colorante chez le B. pyocyanique (Ann. Inst Pasteur, t. I, p. 581).

1888 *Koch*. — Uber morphologie und Entwieklungsgeschite einiger Bakterienformen (Bota. Zeitung, p. 581).

1888 *Wasserzug*. — Variations durables de la forme et de la fonction chez les Bactéries (Ann Inst. Pasteur, t. II, p. 154).

1889 *Massart (J.)*. — Sensibilité et adaptation des Organismes à la concentration des solutions salines (Arch. de Biologie, t. IX, p. 515).

1889. *Metchnikoff*. — Note sur le pléomorphisme des Bactéries (Ann. Inst. Pasteur, t. III, p. 61 et 265).

1889-90. *Linossier (G.)* — Sur une hématine végétale : l'aspergilline, pigment des Spores de l'Aspergillus niger (Ann. de micrographie, t. III, p. 359).

1889. *Winogradsky (S.)*. — Sur le polymorphisme des Bactéries (Ann. de l'Inst Pasteur, t III, p. 249-253).

1889. *De Toni (J.-B.) et Trevisan (V.)*. — Sylloge Schizomycetum. Décembre, Patavu, 1889, p. 959-976-977).

1891 *Eisenberg (J.)*. — Bakteriologische Diagnostik. Leopold Voss. Hambourg et Leipzig, nos 60-61-63-64-65-66-68-69-116-144.

1891. *Linossier (G.)*. — Sur une hématine végétale : l'aspergilline, pigment des spores de l'aspergillus niger (C. R. Acad. Sciences, t. CXII, p. 489).

1891. *Perdrix*. — Sur les fermentations produites par un microbe anaérobie de l'eau (Ann. Inst. Pasteur, t. V, p. 287).

1893. *Grimbert* (*L.*). — Fermentation anaérobie produite par le Bacillus orthobutylicus ; ses variations sous certaines influences biologiques (Thèse Sciences Physiques, Paris, 1893, 82 pages).

1893. — Fermentation anaérobie produite par le Bacillus orthobutylicus (Ann. Inst. Pasteur, t. VII, p. 353).

1894. *Gamaleia.* — Hétéromorphisme des Bacteries sous l'influence des sels de lithium (Wratsch, nos 19 et 20 Ref. Ann. de Micrographie t. VII, 1895, p. 174).

1895. *Babes.* — Beobachtungen uber die metachromatischen Körperchen. Sporenbildung, Verzeigung Kolben und Kapselbildung pathogener Bakterien (Zeitschr. f. Hyg., Bd. XX, p. 412).

1895. *Fischer* (*A.*). — Untersuchungen uber Bakterien (Pringsh. Jahrb. f. Wissenschaftl. Bot. Bd. XXVII, p. 1).

1895. *Nicolle.* — Pratique des colorations microbiennes. Méthode de Gram modifiée et méthode directe (Ann. Inst. Pasteur, t. IX).

1897. *Imbeaux* (*C.*). — Les eaux potables et leur rôle hygiénique dans le département de Meurthe-et-Moselle (Thèse Médecine, Nancy, 1897).

1897. *Claudius.* — Méthode de coloration à la fois simple et contrastante des microbes (Ann. Inst. Pasteur, t. IX, p. 332).

1897. *Migula.* — System der Bakterien (t. I, p. 132, Fischer, léna).

1897. *Radais.* — Sur une nouvelle race de bacille pyocyanique (C. R. Soc. de Biologie, t 49, p. 808).

1897 *Sternberg* (*G.*). — A. Text. Book of Bacteriology Churchill, Londres 1897, p. 456.

1897. *Migula.* — System der Bakterien, Fischer, G. I, Bd. 368 pages.

1898. *Duclaux* (*E.*). — Traité de Microbiologie, t. I, Microbiologie générale, p. 225, 236, 273 ; t. III, Fermentation alcoolique, 1900, p. 164).

1898. *Grimbert* (*L.*). — De l'unification des méthodes de cultures en Bactériologie (Arch. de parasitologie, I, p. 191).

1898. *Grimbert* (*L.*). — Action du B. Coli et du B. d'Eberth sur les nitrates (C. R. Acad. Sciences, 14 décembre).

1898. *Serkowski* (*S.*). — Sur la structure des colonies bactériennes avec un essai d'une nouvelle classification des Bactéries (Archives russes de Pathologie, t. VI, p. 395).

1899. *Meyer* (*A.*). — Uber Geisseln, Reservestoffe, Kerne und Sporenbildung der Bakterien (Flora Botan, Bd. LXXXVI, Heft 5, p. 429).

1900. *Thiry* (*G.*). — Bacille polychrome et Actinomyces mordoré. Recherches biologiques sur les Bactéries bleues et violettes. Polychromisme. Corps bactériens et cristaux colorés (Baillière, Paris).

1900. *Bordet* (*J.*). — Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines (Ann. Inst. Pasteur, t. 14, p. 257).

1900. *Mafiltano (G.)* — La protéolyse chez l'Aspergillus niger (Ann. Inst Pasteur, t. 14, p. 60 et 420).

1900. *Kuntz.* — Ein Beitrag zur Kentniss der Bedigungen der Farbstoffbildung des Bacillus prodigiosus (Zeitschr. f. Hyg., Bd. XXXIV, p. 169).

1900. *Marx et Woithe* — Morphologische Untersuchungen zur Biologie der Bakterien (Centralbl. f. Bakter., I, Origin., Bd. XXVIII, p. 1, 33, 65, 97)

1900 *Migula (W.).* — System du Bakterien. Fischer, Iéna, t. II. p. 845-846-847-848-849-850-851-852 853-854-855 856-857-858-859-860-861-862-863-865).

1901. *Krompecher.* — Untersuchungen über das Verkommen metachromatischer Körnchen bei sporentragenden Bakterien und Beitrage zur Kenntniss der Babes-Ernst'schen Körperchen (Centralbl. f. Bakter., I, Origin., Bd. XXX, p. 425).

1901 *Gottheil.* — Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien (Centralbl. f. Bakter., II, Abt , Bd. VII, p. 430).

1901. *Bordet (J.) et Gengou (O.).* — Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums anti-microbiens (Ann. Inst Pasteur, t. 15, p. 289).

1901. *Strasburger.* — Ueber Plasmaverbindungen pflanzlicher Zellen (Pringsh Jahrb. f. Wissenschaftl. Botanik, p. 493)

1901 *Bordet (J.).* — Sur le mode d'action des sérums cytologiques et sur l'unité de l'alexine dans un même sérum (Ann. Inst. Pasteur, t. 15, p. 303).

1901. *Marx et Woithe.* — Ein Verfahren zur Virulenzbestimmung der Bakterien (Arbeiten aus der Kgl. Chirurg. Klinik. Berlin, Bd. XV).

1902. *Gruber (Th.).* — Pseudomonas Fragariœ. — Eine Erdbeergeruch erzeugende Bakterie (Centralbl. Bakter , II, Abt , t. IX, p. 705).

1902 *Eisenberg (Ph.).* — Über elastikotropische Erscheinungen beim Wachstum des Bac. anthracis und verwandter Bacillen auf Serumnährboden (Centralbl. f. Bakter., origin., Bd., 48, p. 125).

1902 *Hefferan (M.).* — An unusual bacterial grouping (Centralbl f. Bakter , Bd. VIII, II Abt., p. 689).

1902 *Ellis.* — Beiträge zur Kenntniss der Coccaceen und Spirillaceen Centralbl f. Bakter., origin , I Abt., Bd. XXXII, p. 1).

1902 *Grimme.* - Die wichtigsten Methoden der Bakterienfarbung in ihrer Wirkung an die Membrane, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle (Centralbl. f. Bakter., I Abt. Bd. XXXII).

1902. *Guillermond.* — Sur la présence des corpuscules métachromatiques dans les Bactéries (Lyon médical, journal du 13 juillet 1902).

1902. *Schaudinn.* — Beiträge zur Kenntniss der Bakterien und Verwand-

ter Organismen I Bacillus Bütschlii n. sp. (Arch. f. Protistenkunde, Bd. I, p. 306).

1902. *Thiry* (*G.*). — De l'unification des méthodes d'études et d'exposition en Microbiologie (C. R. du Congrès des Sociétés savantes, 1902).

1902 *Teïsi Matzuschita*. — Bacteriologische Diagnostik. Fischer, léna, p. 36, 42, 144, 146, 150, 168, 220, 222, 240, 289.

1903 *Thiry* (*G*.). — Diagnostic de quelques Microorganismes chromogènes rouges d'après le système de Teïsi Matzuschita (Extrait de la Revue médicale de l'Est, 1903).

1903. *Ellis*. — Der Nachweiss der Geisseln bei allen Coccaceen (Centralbl. f. Bakter., I, Abt., p. 1-53).

1903. *Grimbert* (*L.*). — Diagnostic des Bactéries par leurs fonctions biochimiques (Arch. de Parasitologie, t. VII, n° 2, p. 237).

1903. *Grimme* (*A.*). — Die wichtigsten Methoden der Bakterienfarbung in ihrer Wirkung an die Membran, den Protoplasten und die Einschlusse der Bakterienzelle (Centralbl. f. Bakter., I, Abt., Bd. XXXII).

1903. *Lehmann et Fried*. — Beobachtungen über die Eigenbewegung der Bakterien (Arch. f. Hyg., p. 311).

1903 *Samkow* (*S.*). — Zur Physiologie des Bacillus prodigiosus (Centralbl. f. Bakter., II, Abt., Bd. XI, p. 305).

1904. *Swellengrebel*. — Quelques notes sur la morphologie, la biologie du Bacterium Zopfii Kurth (Ann. Inst. Pasteur, t. 18, p. 712).

1904. *Neide*. — Botanische Beschreibung einiger sporenbildenden Bakterien (Centralbl. f. Bakter , II, Abt., Bd. XII, p. 1).

1906. *Macé*. — Traité de Bactériologie, 5e édition, Baillière. Paris.

1904. *Bordet* (*J.*). — Les propriétés des anti-sensibilisatrices et les théories chimiques de l'immunité (Ann. Inst. Pasteur, t. 18, p. 593).

1904. *Malfitano* (*G.*). — Tubes de Mette d'albumine et de gélatine gradués et stériles (C. R. Soc. de Biologie, t. 56, p. 33, 9 janvier).

1904. *Neide*. — Uei Alkoholentfärbung der nach Gram gefärbten, Bakterien als Speciesdiagnose, in Verbindung mit einer Untersuchung der fur die Gram-Färbung in Betracht Kommenden Faktoren (Centralbl. f. Bakter., I, Abt., Bd. XXXV, p. 508).

1904. *Meyer* (*A.*). — Uber geisseln Reservstoffe Kerne und Sporenbildung der Bakterien (Flora Botan., LXXXI, p. 429).

1905. *De Waele* (*H.*) *et Vandevelde* (*A.-J.*). — Sur les ferments protéolytiques des microbes et une méthode d'évaluation quantitative de la liquéfaction de la gélatine (Centralbl. f. Bakter., I, Origin., Bd. XXXIX, p. 353).

1905. *Malfitano* (*G.*). — Sur la dissociation du pouvoir albuminolytique

et du pouvoir gélatinolytique de la protéase charbonneuse (C. R. Soc. de Biologie, t. 55, p. 543).

1905. Report of commitee on Standart methods of water analysis to the Laboratory section of the américan public Health association (Journ. of. Inf. Disc., suppl. n° 2, mai 1905).

1905. *Ruata (G.).* — La formation des granulations dans les cultures de Vibrions (Ann. Inst. Pasteur, t. 19, p. 661).

1105 *Sullivan.* — Synthetic cultur media and the biochemistry of bacterial pigments (Journ. of medica Research, t. XIV, n° 1, nov. 1905, p. 109, 160. Refer. Bull. Inst. Pasteur, t. IV, p. 354, 1906).

1905. *Gay (F.-P.)* — La déviation de l'Alexine dans l'hémolyse (Ann. Inst. Pasteur, t. 19, p. 592).

1905. *Malfitano (G.) et Strada (F.).* — Evaluation du pouvoir protéolytique des Bactéridies du charbon (C. R. Soc. de Biologie, t. 57, p. 118-120).

1905. — Des variations dans l'âctivité protéolytique des Bactéridies avec l'âge des cultures (C. R. Soc. de Biologie, t. 57, p. 195-197).

1906. *Sergent (Ed ).* — Des tropismes du Bactérium Zopfii Kurth. (Ann. Inst. Pasteur, t. 20, p. 1005).

1906. *Fischer (A.).* — Ueber Plasmoptyse der Bakterien. (Bericht. d. deutsch. botanisch. Gesellsch. Bd. XXIV, p. 55).

1906. *Meyer (A ).* — Ueber Alfred Fischer's Plasmoptyse der Bakterien. (Bericht. d. deutsch. botanisch. Gesellscht. Bd. XXIV, p. 208).

1906. *Cotton et Mouton.* — Les ultramicroscopes (Masson, 1906, p. 14, 23).

1906. *Errera (L.)* — Sur l'emploi de l'encre de chine en microscopie (Recueil de l'Inst. Bot. t. II, p. 103.)

1906 — Sur la limite de petitesse des Organismes (Recueil Inst. Bot., t. VI, p. 73).

1907 *Sergent (Ed.).* — Des tropismes de Bacterium Zopfii Kurth. (Ann. Inst. Pasteur, t. 21, p. 842).

1907. *Malfitano (G.) et Lazarus (E ).* — Influence de la concentration en peptone des milieux sur le pouvoir protéolytique de la Bactéridie charbonneuse (C. R. Soc. de Biologie, t. 63, p. 761 et 763).

1907. *Hutchinson (H.-B.).* — Uber Form und Bander Kolonien niederer Pilzen (Centralbl. f. Bakter., II Abt., Bd. XVII, p. 65, 129, 321, 323, 325, 417, 593).

1908. *Brudny* — Uber die Beziehung zwicher der Färbbarkeit der Bakterien nach Gram und ihrer Permeabilität (Centralbl. f. Bakter., II Abt , Bd. XXI, p. 62).

1908. *Guillemard.* — Utilisation des solutions salines à la différenciation des Bactériacées (C. R. Acad. Sciences, t. 146, p. 1117).

1908. *Crendiropoulo.* — Sur le mécanisme de la réaction de Bordet-Gengou (Ann. Inst. Pasteur, t. 22, p. 728).

1908. *Bordet (J.) et Gay (F.).* — L'absorption de l'alexine et le pouvoir antagoniste des sérums normaux (Ann. Inst. Pasteur, 1908, t. 22, p. 625).

1908. — *Simon (D.).* — Contribution à l'étude du Bacillus syncyanus et de son pigment (Thèse de Doctorat d'Université de Nancy, p. 20).

1909. *Holzmuller.* — Die Gruppe des Bacillus mycoïdes Flügge (Centralbl. f. Bakter, II Abt., Bd. XXIII, p. 315).

1909. *De Waele (H.).* — Protéolase et antiprotéolase dans les cultures microbiennes (Centralbl. f. Bakter, origin., p. 40-44).

1909. *Burri.* — Das Tucheverfahren (G. Fischer, Iéna).

1909. *Grimbert (L.) et Bagros (M.).* — Sur le mécanisme de la dénitrification chez les Bactéries dénitrifiantes indirectes (C. R. Soc. de Biologie, t. LXVI, p. 760).

1909. *Guillemard.* — Diversité des résistances des Bactéries à la pression osmotique (C. R. Soc. de Biologie, LLXVII p. 538).

1910. *Lazarus (E.).* — Sur la proteolyse de la Bactéridie charbonneuse (Ann. Inst. Pasteur, t. 23, p. 577-594).

1910. *Dobrwotski.* — Des microbes producteurs de phénol (Ann. Inst. Pasteur, t. 24, p. 595 à 605.)

1910. *Guillermond.* — A propos des corpuscules métachromatiques ou grains de volutine.

1910. *Guillemard.* — Action comparée à l'égard des Bactéries, des solutions salines, relativement à leur degré de dissociation (C R. Soc. de Biologie, t. LXIX, p. 141.)

1910. *Linossier (G.).* — Influence du fer sur la formation des spores de l'Aspergillus niger (C. R. Acad. Sciences, t. CLI, p. 1074.)

1910. *Dubois (R.).* Utilisation des solutions salines concentrées à la différenciation des Bactéries (C. R. Soc. de Biologie, t. LXVIII, p 26.)

1910. *Sauton.* — Influence du fer sur la formation des spores de l'Aspergilhes niger (C. R. Acad Sciences, T. CLI, p. 241.)

1911. *Crendiropoulo.* — Sur le mécanisme de la réaction de Bordet-Gengou (Ann. Inst. Pasteur, t. 25, p. 277.)

1911. *Kufferath.* — Notes sur les tropismes du Bactérium Zopfii Kurth (Ann. Inst. Pasteur, t. 25, p. 601.)

1911. *Lasseur (Ph.).* — Contribution à l'étude du Bacillus Chlororaphis G et S (Thèse Sciences naturelles. Nancy, 198 pages, 1 planche, p. 83, 65.)

— Le Bacillus Chlororaphis. Influence du fer sur la production de la Chlororaphine (C. R. Soc. de Biologie, t. LXX, p. 154.)

— Contribution à l'étude du Bacillus chlororaphis (fig. 2, 5, 6, 8, 9.)

1912. *Kolle et Wassermann.* — Handbuch der Pathogenen Microorganismen (Bd. I, 2e Aufl. p. 142, Fischer, Iéna)

1912. *Calmette et Massol (L.).* — Détermination du pouvoir antigène des diverses tuberculines et titrages des sensibilisatrices ou anticorps

des sérums tuberculeux (C. R. Soc. de Biologie, 6 janvier, t. I, t. 72, p. 15.)

1912 *Gauthier*. — Recherche sur l'indol en microbiologie (Thèse Pharmacie, Lyon, Rey, imprimeur éditeur.)

1912. *Lasseur* (*Ph.*). — Contribution à l'étude de Bacillus. Le Monnieri, nov. spec. (C. R. Soc de Biologie, T. LXXIV, p. 67.)

1913 *Lehmann et Neumann*. — Manuel de Bactériologie (Baillière. Paris, p. 59.)

1913 *Langeron*. — Précis de technique microscopique. p. 181. Masson. Paris.

1913. *Lasseur* (*Ph.*). — Les milieux synthétiques. Influences du fer sur la végétation et la coloration des cultures de certaines Bactéries (Soc. des sciences de Nancy, séance du 1er février 1913.)

— Observation sur le pouvoir chromogène de quelques Bactéries (Recueil publié à l'occasion du Jubilé scientifique du professeur G. Le Monnier, novembre 1913, p 99, 113.)

1913. *Vuillemin* (*P.*). — Genera Schizomycetum (Ann. mycologici, t. XI, p. 512).

1913. *Lasseur* (*Ph.*). — Influence du fer sur la végétation et la coloration des cultures de diverses Bactéries (C. R. Soc. de Biologie, t. XXIV, p. 496).

1913. *Lasseur* (*Ph.*) *et Thiry* (*G.*). — Sur les cultures colorées de Bactéries considérées jusqu'à présent comme achromogènes (C. R. Acad. Sciences, t. 156, p. 166).

1913. — Nouvelles colorations présentées par certains micro-organismes cultivés en milieux synthétiques (C R. Soc. de Biologie, . LXXIV, p. 163).

1914. *Calmette* (*A.*) *et Massol* (*L.*). — Contribution à l'étude de la réaction de fixation de Bordet-Gengou au cours de l'infection et immunité tuberculeuse (Ann. Inst. Pasteur, t. 28, p. 338).

1914. *Lasseur* (*Ph.*) — Sur l'extraction des pigments bactériens (C. R. Soc. de Biologie, t. LXXVI, p. 819).

1915. *Hollande* (*A.-Ch.*) *et Gaté* (J.). Lait éthérifié comme milieu de culture et de différenciation des Bacilles du groupe Eberth-Coli (C. S. Soc. de Biologie, t. LXXVIII, p. 722).

4916 *Hollande* (*A.-Ch.*) *et Bauverie* (*J.*). — Corpuscules métachromatiques des Champignons des teignes ; nouvelle technique de différenciation de ces parasites (C. R. Soc. de Biologie, p. 604).

1917 *Hollande* (*A-Ch.*). — Imprégnation argentique sans précipité du Treponema pallidum dans les frottis (C. R. Soc. de Biologie, t. LXXX, p. 7).

1919. *Launoy*. — Sur l'antiprotéase du Bacille pyocyanique (C. R. Soc de Biologie, t. 82, p. 263).

1919. *Gessard.* — Diagnose pigmentaire du Bacille pyocyanique (Ann. Inst. Pasteur, t. XXXIII, p. 240).

1919. *Mamelle.* — Contribution à l'étude du Bacille pyocyaneus erythrogenes Gessard (Thèse Pharmacie, Nancy, p. 82 et suiv.).

1920. *Gessard* (*C.*). — Technique d'identification des germes pyocyaniques (Ann. Inst. Pasteur, t. XXXIV, p. 88, février 1920).

*Schmitt* (*E.*). — Contribution à l'étude de la coloration de Gram (C R. Soc. de Biologie, t. 83, 1r mai 1920).

# PLANCHE I

## Différents aspects de B. Bruntzii

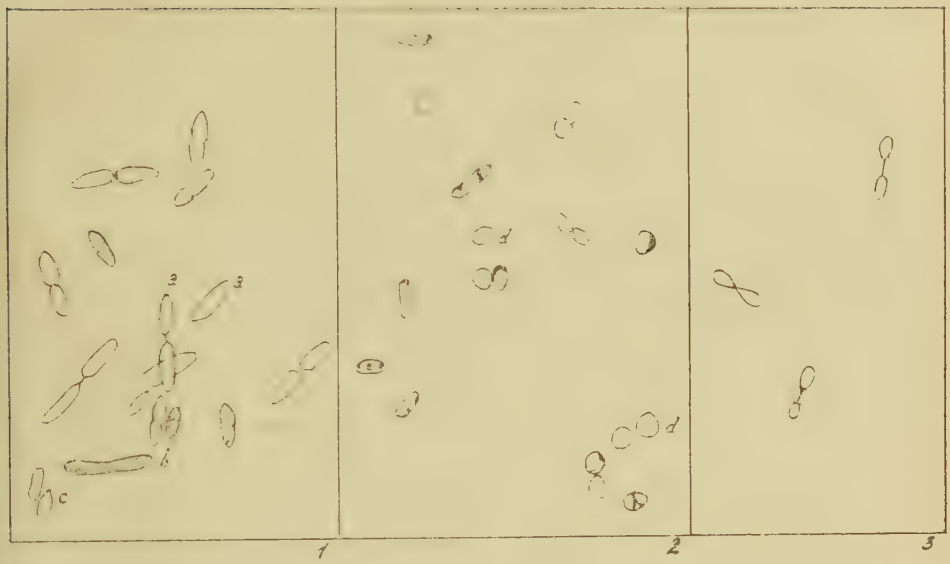



Fig. 1. — Culture de 24 heures (Gélose).
(*a*) Formes en bâtonnets
(*b*) Formes rarement rencontrées en grands bâtonnets
(*c*) Formes plus courtes que les formes ordinaires

Fig. 2. — Culture de 16 jours (Milieu Synthétique). Coloration au bleu de toluidine très dilué.
(*d*) Formes rondes.

Fig. 3. — Culture de 20 jours (milieu synthétique) :
(*f*) Formes rondes.

Fig. 4. — Culture de 4 jours à la température du laboratoire (Bouillon phéniqué à 1 0,00) :
Fig. de gauche : État frais.
Fig. de droite : B. Bruntzii desséché, fixé à la flamme et coloré à la fuchsine.

Échelle : 0 — 10μ — 20μ

# PLANCHE II

## Culture sur gélatine

Gr = 80 fois

un millimètre divisé en dix

I

II

III

24 heures

48 heures

56 heures

Colonies superficielles (très peu espacées)

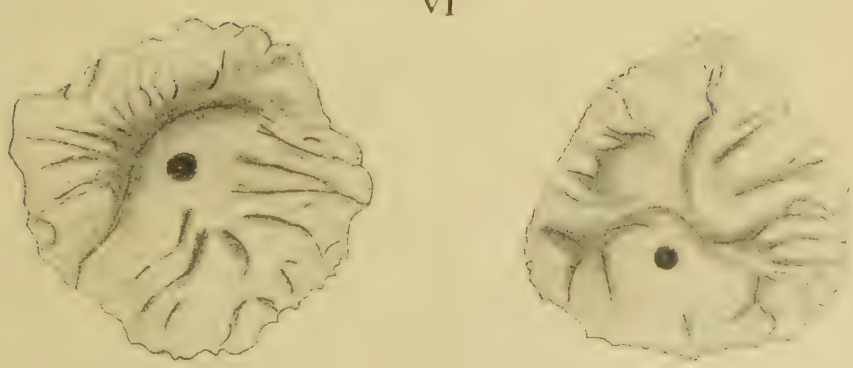
IV

V

24 heures

36 heures

VI



48 heures

Colonies superficielles (espacées)

# PLANCHE III

## Culture sur gélatine

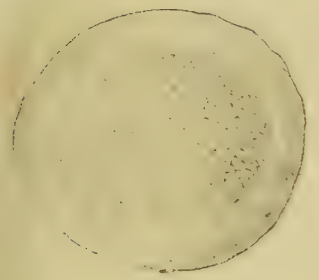
Fig. VII

Colonie de 3 jours

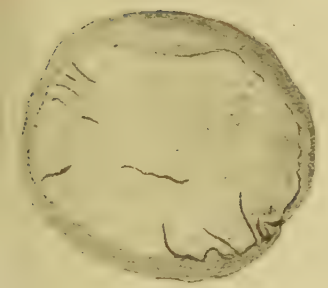
Elle est transparente, bleutée, en montagne ; ses bords sont profondément lobés, et les lobes sont parfois lobulés ; elle est vallonnée, à crête sinueuse. On observe des canaux aussi bien dans les dépressions que dans les crêtes. Au centre, le noyau s'est développé non seulement en largeur, mais en hauteur en forme hélicoïdale.

# PLANCHE IV

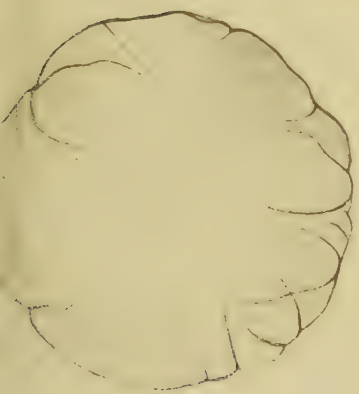
## Culture sur gélatine



20 heures



24 heures



6 jours

Colonies des couches très voisines de la surface

Colonies des couches profondes

Fl. Nepveux

# TABLE DES MATIERES


Pages

Introduction ..... 7

CHAPITRE I

Origine ..... 11
Morphologie et Physiologie ..... 12
*a*) Dimensions ..... 15
*b*) Forme ..... 16
*c*) Motilité ; fouets ..... 29
*d*) Cytoplasme ..... 34
*e*) Substances de réserve ..... 36
1. — Matières grasses ..... 36
2. — Volutine ..... 36
3. — Glycogène et iogène ..... 37
*f*) Membrane ..... 38
*g*) Plasmodème ..... 40
*h*) Forme de repos ..... 41
*i*) Caractères de coloration ..... 42

CHAPITRE II

Caractères biologiques ..... 46
Cultures en milieux non chimiquement définis ..... 46
*a*) Vitalité ..... 46
*b*) Aérobiose, anaérobiose ..... 47
*c*) Résistance aux agents physiques ..... 48
*d*) Point osmotique ..... 51
*e*) Action de l'acide phénique ..... 52
Planches ..... 53
Cultures sur gélatine ..... 54
Colonies superficielles ..... 58
1er type : colonies en feuille de vigne ..... 59
2e type : colonies opaques ..... 61
Condition d'obtention des colonies superficielles ..... 64
Colonies profondes ..... 65
Cultures sur gélose ..... 67
— bouillon ..... 67

— eau peptonée ..... 68
— pomme de terre ..... 68
— carotte ..... 69
— sérum coagulé ..... 69
— ascite ..... 69
— lait ..... 70
Indol-Phénol ..... 71
Action sur les sucres ..... 73
— les alcools polyatomiques ..... 74
— les nitrates ..... 74
Ferments ..... 75
1° Action sur la gélatine ..... 75
— sur le sérum coagulé ..... 77
— sur le blanc d'œuf ..... 77
— sur la fibrine ..... 77

CHAPITRE III

Cultures en milieu synthétique de Lasseur ..... 79
Caractères des cultures ..... 79
Action des aliments hydro-carbonés ..... 81
— du sulfate de magnésie ..... 83
— du fer ..... 84
Influence de la semence ..... 89
Origine de la semence ..... 90
Variations dans la production de la substance colorée ..... 90

CHAPITRE IV

Propriétés physico-chimiques du pigment ..... 94
Extraction de la substance colorée ..... 94
Etude sommaire du spectre d'absorption ..... 95

CHAPITRE V

Action pathogène ..... 97
Sérologie ..... 100

CHAPITRE VI

B. Bruntzii et Bacilles producteurs de pigments rouges ..... 104
Caractères différentiels ..... 104
Conclusions ..... 117
Index bibliographique ..... 119
Planches ..... 127

Imp. de la Faculté de Médecine, 15, rue Racine, Paris. — 4750-20